

**SPALTUNG VON
TRANSFER-RIBONUCLEINSÄUREN
DURCH EXO- UND ENDONUCLEASEN**

Peter Philippsen

'972
—

DISSERTATIONS – und FOTODRUCK FRANK oHG
8000 München 2 · Gabelsbergerstr. 15 · Tel.: 2 80 90 90

SPALTUNG VON TRANSFER-RIBONUCLEINSÄUREN
DURCH EXO- UND ENDONUCLEASEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der naturwissenschaftlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München



vorgelegt von
Peter Philippsen
aus Lüneburg

München 1971



1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lynen
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H.G. Zachau

Tag der mündlichen Prüfung: 9.2.1972

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie der Universität München in der Zeit vom Januar 1968 bis April 1971 ausgeführt.

Ergebnisse aus dieser Arbeit wurden teilweise veröffentlicht:

P. Philippsen, R. Thiede,
W. Wintermeyer und H. G. Zachau,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 33 (1968) 922.

P. Philippsen und H. G. Zachau,
FEBS Letters, 15 (1971) 69

Herrn Prof. Dr. H. G. Zachau danke ich vielmals für die Förderung dieser Arbeit.
Den Kollegen der Abteilung danke ich für anregende Diskussionen.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Spaltung von Transfer-Ribonucleinsäuren (tRNAs) mit einer Nuclease aus Schafsnieren (SNN)	5
2.1 Spaltung von tRNA ^{Phe} mit SNN	5
2.1.1 Auswertung der Spaltmuster in analytischen Gelen	5
2.1.2 Präparative Darstellung des Fragments Phe 1-69/70	12
2.1.3 Oligonucleotidanalyse des Fragments Phe 1-69/70	13
2.2 Spaltung von tRNA ^{Tyr} mit SNN	15
2.3 Spaltung von tRNA ^{Ser} _{II} mit SNN	19
2.4 Spaltung weiterer tRNAs mit SNN	22
2.5 Akzeptoraktivität für Aminosäuren im Verlauf der Spaltung mit SNN	23
2.6 Diskussion der Ergebnisse hinsichtlich der Spezifität der SNN und der Struktur der tRNA	24
3. Abbau von Transfer-Ribonucleinsäuren mit einer Exonuclease aus Schweinemilz (Milz-PDE)	26
3.1 Abbau von dephosphorylierter tRNA ^{Phe}	27
3.2 Abbau von dephosphorylierter tRNA ^{Ser} _{I, II}	31
3.3 Abbau von dephosphorylierter tRNA ^{Tyr}	34
3.4 Variation der Abbaubedingungen	37
3.5 Abbau von dephosphorylierter tRNA nach Behandlung mit Borhydrid	41
3.6 Abbau von dephosphorylierter 5 S RNA durch Milz-PDE	43
3.7 Enzym-Substratverhältnis beim Abbau durch Milz-PDE	44

	Seite
3.8	Einfluß der 5'-terminalen Phosphatgruppe auf den Abbau von Nucleotidketten durch Milz-PDE 44
3.9	Darstellung von tRNA-Fragmenten durch teilweisen Abbau mit Milz-PDE 45
3.10	Analyse der tRNA-Fragmente 50
3.11	Abbau von tRNA-Fragmenten und Fragmentkombinationen durch Milz-PDE 61
3.11.1	Abbau der dephosphorylierten Fragmente Phe 1-36 und Phe 38-76 61
3.11.2	Abbau des dephosphorylierten Fragments Ser 36-85 65
3.12	Akzeptoraktivität für Aminosäuren von Fragmenten und Fragmentkombinationen 69
3.12.1	Akzeptoraktivität von Kombinationen verschiedener tRNA ^{Phe} -Fragmente 69
3.12.2	Akzeptoraktivität von Kombinationen verschiedener tRNA ^{Ser} -Fragmente 71
3.13	Diskussion 76
3.13.1	Mechanismus des Abbaus von tRNAs und tRNA-Fragmenten durch Milz-PDE 76
3.13.2	Akzeptoraktivität von Fragmenten und Fragmentkombinationen 79
3.13.3	Tertiärstruktur der tRNA 82
4.	Trennung von Nucleinsäuren und Oligonucleotiden in Polyacrylamidgel 84
4.1	Gelsystem zur Trennung von tRNA-Fragmenten 84
4.2	Theorie zur Porenverteilung 86
4.3	Elektrophoretische Beweglichkeit und R _B -Werte von Nucleotidketten unterschiedlicher Länge 89
4.4	Probleme der Trennung und Kettenlängenbestimmung von Oligonucleotiden in Polyacrylamidgel 94

	Seite
4.5	Theorie zu den Eichgeraden 99
4.6	Quantitative Auswertung von Densitogrammen 101
5.	Experimenteller Teil 105
5.1	Spaltungen mit der Endonuclease aus Schafsniere 105
5.2	Abbau mit Milz-PDE 106
5.3	Aktivitätstest der Nucleasen 107
5.4	Analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese 108
5.5	Präparative Gelelektrophorese 113
5.6	Präparative Spaltungen mit Milz-PDE 116
5.7	Abspaltung des 5'-terminalen Phosphats 116
5.8	Einbau von Aminosäuren in tRNAs und Fragmentkombinationen 117
5.9	Analyse von tRNA-Fragmenten 118
5.10	Radioaktivitätsmessungen 119
5.11	Materialien 120
6.	Zusammenfassung der Ergebnisse 123
7.	Literaturverzeichnis 126
8.	Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung und Problemstellung

Spezifische Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Nucleinsäuren sind bei der Transcription und Translation der genetischen Information sowie bei der Regulation von Genaktivitäten von entscheidender Bedeutung (1-4). Leicht zugängliche Modelle zum Studium solcher Wechselwirkungen sind die Reaktionen der kleinsten biologisch aktiven Nucleinsäuren, der Transfer-Ribonucleinsäuren, mit Nucleasen und Aminoacyl-tRNA-Synthetasen.

Von den Transfer-Ribonucleinsäuren (tRNAs) sind bereits zahlreiche Sequenzen bekannt (5). Versucht man die Nucleotidketten der tRNAs nach dem Prinzip maximaler Basenpaarung in sich zurückzufalten, so ergibt sich aus den resultierenden doppelsträngigen Stämmen und einsträngigen Schleifen die Figur eines Kleeblattes (Abbildung 1a). Dieses Modell für die Sekundärstruktur ist in vielen Einzelheiten gesichert (5). Für die Tertiärstruktur sind Modelle vorgeschlagen worden, bei denen die räumliche Lage der Stämme zueinander und die Anzahl zusätzlicher Basenpaare zwischen den verschiedenen Einzelsträngen variieren (6, 7). Abbildung 1b zeigt als Beispiel ein Kalottenmodell für Hefe tRNA^{Ser}, das nach dem allgemeinen Modell von Fuller et al. (8) gebaut wurde.

Von den verschiedenen Nucleasen, die bisher isoliert und untersucht wurden, benötigen einige zur Spaltung einer Phosphodiesterbindung die Wechselwirkung mit einer bestimmten heterocyclischen Base (z. B. 10, 11). Ob das π -Elektronensystem, die mögliche Zahl von Wasserstoffbrücken oder bestimmte Ionisationspotentiale dabei eine Rolle spielen, ist nicht eindeutig bekannt (10-12). Andere Nucleasen können nicht zwischen den verschiedenen heterocyclischen Basen unterscheiden und spalten allgemein einsträngige Bereiche in Nucleinsäuren (z. B. 13, 14). Von den eben erwähnten Endonucleasen muß man die Exonucleasen unterscheiden, die eine Richtungsspezifität besitzen. Einige bauen Nucleotidketten vom 5'- zum 3'-Ende, und andere vom 3'- zum 5'-Ende ab (z. B. 15, 16). Manche reagieren dabei nur mit Einzelsträngen, andere nur mit Doppelsträngen (17). Für den Mechanismus von Exonucleasen

Abbildung 1: Strukturmodelle für tRNA

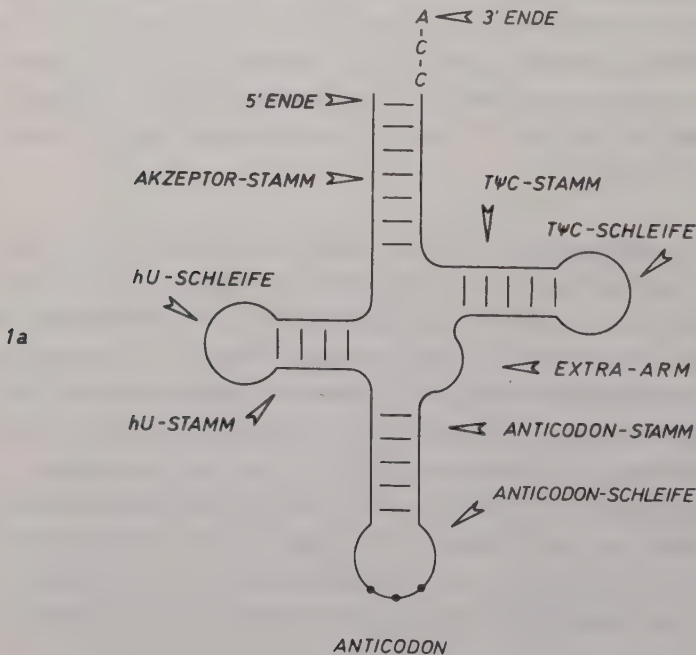
a) Allgemeines Kleeblattmodell der tRNA

An das 3'-Ende wird die zugehörige Aminosäure gebunden. Das Anticodon bindet mit dem entsprechenden Condon einer mRNA. In manchen tRNAs ist der Extraarm um 3-5 Basenpaare vergrößert (siehe Teil b dieser Abbildung).

b) Kalottenmodell der Hefe tRNA^{Ser} nach dem von Fuller et al. (8) postulierten allgemeinen Tertiärstrukturmodell für tRNAs.

Kohlenstoffatome sind schwarz, Wasserstoffatome weiß, Stickstoffatome hellgrau und Sauerstoffatome dunkelgrau. Die Phosphoratome erkennt man an ihrer Bindung mit vier Sauerstoffatomen.

Der Pfeil "IGA" zeigt auf das Inosin des Anticodons der tRNA. An das Anticodon IGA (9) ist das Condon UCU einer mRNA gebunden.



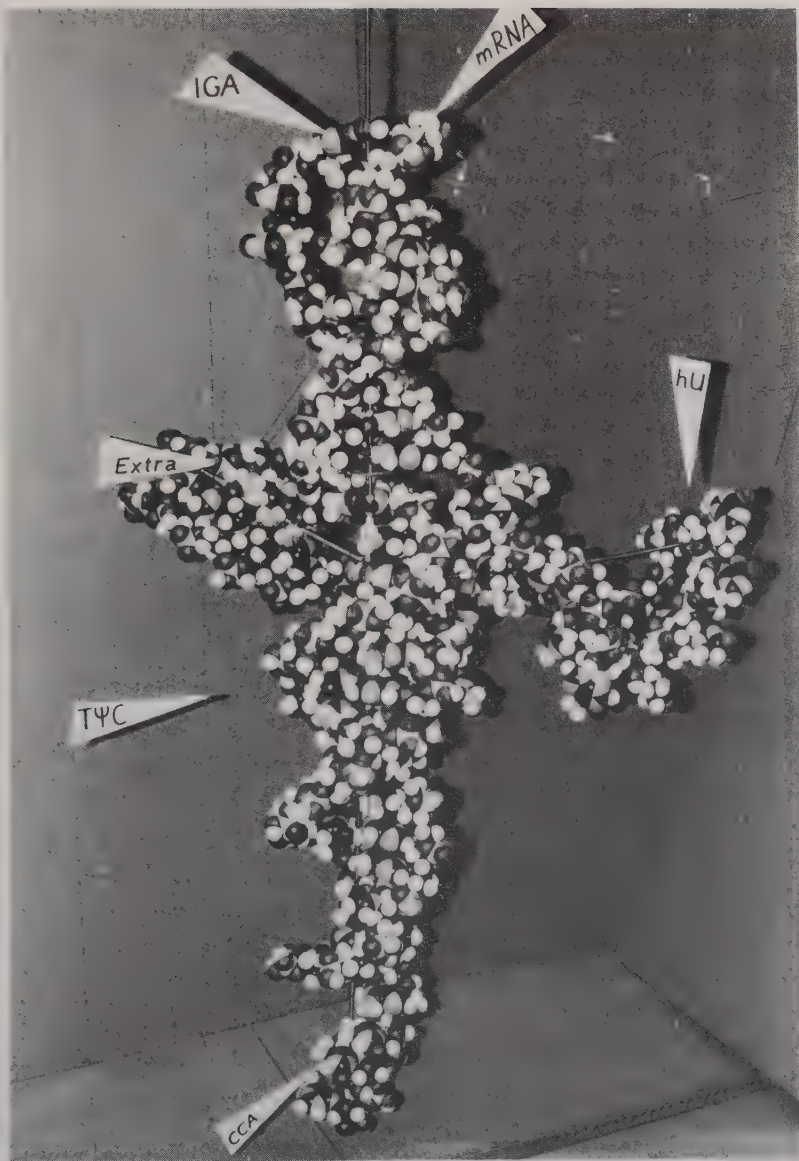


Abbildung 1b

gibt es zwei grundsätzlich verschiedene Möglichkeiten. Entweder dissoziiert der Komplex aus Nuclease und Nucleinsäure nach jeder Phosphodiestererspaltung, so daß alle Ketten mit einer statistischen Streuung gleichmäßig verkürzt werden (synchroner Abbau), oder eine Nucleinsäure wird zunächst vollständig zu Mononucleotiden abgebaut, bevor die Exonuclease ein anderes Substratmolekül bindet (asynchroner Abbau).

Die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen sorgen für die spezifische Beladung der tRNAs mit Aminosäuren (18). Dabei muß jede tRNA-Spezies von ihrer Synthetase erkannt werden. Man weiß, daß in diesem Erkennungsmechanismus nicht nur die Sequenz, sondern auch die Raumstruktur der tRNA eine Rolle spielt (19, 20). Es gibt mehrere prinzipiell verschiedene Methoden, um Hinweise darauf zu erhalten, welche Bereiche einer tRNA für die Spezifität dieser Beladungsreaktion verantwortlich sind. Eine Methode besteht im Sequenzvergleich von tRNAs, die durch dasselbe Enzym beladen werden (21). Sodann kann man bestimmte Nucleotide einer tRNA chemisch modifizieren (z. B. 22, 23), oder man läßt Fragmente von tRNAs zu Komplexen rekombinieren, denen im Vergleich zur ganzen tRNA Nucleotide aus bestimmten Bereichen fehlen (z. B. 24-28). Anschließend wird die Aminoacylierung dieser Substrate getestet.

In der vorliegenden Arbeit soll die Reaktion mehrerer tRNAs und tRNA-Fragmente mit einer Endonuclease aus Schafsnieren und einer Exonuclease aus Schweinemilz untersucht werden. Die Endonuclease spaltet vornehmlich in einsträngigen Bereichen von Polynucleotiden (13), und die bevorzugten Angriffsstellen bei der Reaktion mit tRNAs sollten daher exponierte Einzelstrangbereiche in der Raumstruktur sein. Die Exonuclease baut Nucleinsäuren vom 5'-Ende her ab (15). Der Mechanismus dieses Abbaus und der Einfluß von Sequenz und Sekundärstruktur der Substrate auf die Wechselwirkungen mit der Exonuclease sollen untersucht werden. Weiterhin dürfte es mit dieser Nuclease möglich sein, um ein paar Nucleotide verkürzte tRNA-Moleküle mit intaktem CCA-Ende zu gewinnen, die interessante Substrate für Aminoacyl-tRNA-Synthetasen sind. Ferner sollen Bedingungen ausgearbeitet werden, um mit Hilfe der Elektrophorese in Polyacrylamidgel Spaltungskinetiken schnell und quantitativ auszuwerten.

2. Spaltung von Transfer-Ribonucleinsäuren mit einer Nuclease aus Schafsniere

K. Kasai und M. Grunberg-Manago beschreiben eine Endonuclease aus Schafsniere (13), die bei neutralem pH in Poly A, Poly C, denaturierter DNA, rRNA und tRNA Phosphodiesterbindungen spaltet. Dabei entstehen keine Mononucleotide, sondern Oligonucleotide mit einem Phosphat am 5'-Ende. Native DNA und Komplexe aus Poly A und Poly U sind völlig resistent. Weitere Untersuchungen mit Poly AC (A : C = 1.62) und Poly U zeigen, daß die Nuclease in einem Komplex dieser beiden Polynucleotide hauptsächlich C-reiche Regionen angreift. Diese sollten nach Meinung der Autoren C-reiche unstrukturierte Schleifen sein, die sich im Polynucleotidkomplex ausbilden, da nach den Regeln der komplementären Basenpaarung nur die A-reichen Regionen des Poly AC mit dem Poly U paaren.

Auch unfractionierte tRNA aus Hefe wird untersucht. Die Analyse der entstehenden Produkte zeigt, daß große Fragmente mit einer Kettenlänge von durchschnittlich 40 Nucleotiden und kleine Oligonucleotide entstehen. Die Autoren vermuten auf Grund der Nucleotidzusammensetzung der Fraktionen, daß die großen Fragmente aus halben tRNA-Molekülen mit pG- und CCA-Ende bestehen, daß das CCA-Ende aber auch durch das Enzym abgespalten werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wird eingehend das Verhalten von tRNA^{Phe} (Abb. 2), tRNA^{Tyr} (Abb. 7) und tRNA^{Ser} (Abb. 9) aus Hefe bei der Reaktion mit Schafsnierenuclease (Abk. SNN) untersucht.

2.1 Spaltung der tRNA^{Phe} mit SNN

2.1.1 Auswertung der Spaltmuster in analytischen Gelen

Die tRNA^{Phe} wird durch SNN zu einem Fragment abgebaut, das nach einer Längenbestimmung auf Grund seines R_B -Wertes und einer Eichgeraden (Kap. 4.3) etwa 69

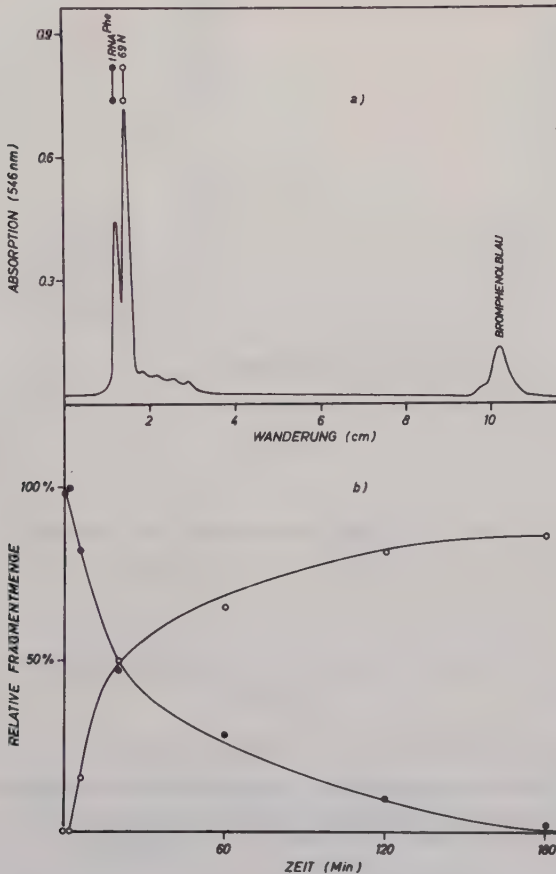
Nucleotide besitzt (Abb. 2a, b). tRNA^{Phe} besteht aus 76 Nucleotiden; etwa 7 Nucleotide werden demnach bei der Reaktion mit SNN abgespalten. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommt man, wenn im Verlauf der Spaltung der Anteil säurelöslicher Nucleotide gemessen wird.

Um sicher zu sein, daß das Fragment 69 N aus einer Nucleotidkette besteht, wird es kurz auf 80°C erhitzt und anschließend wieder im Harnstoffgel untersucht. Nach wie vor läuft das Fragment in einer Bande, selbst wenn die Elektrophorese nicht bei 18°C, sondern bei 50°C durchgeführt wird. Die Nuclease muß demnach im Akzeptorstamm spalten und damit das tRNA-Molekül verkürzen.

Untersucht man im Verlauf der Reaktion die Produkte, indem man sie mit T1-RNase vollständig spaltet, so zeigt sich, daß in dem entstehenden Gemisch von Oligonucleotiden die Menge der Hexanucleotide abnimmt, und zwar bis zum Ende der Reaktion um etwa 30 % (Abb. 2c, d). Da aus der tRNA^{Phe} insgesamt 3 Hexanucleotide entstehen, fehlt also eins davon in der Sequenz des Fragments 69 N. Wie dem Kleeblattmodell der tRNA^{Phe} (Abb. 3) zu entnehmen ist, befindet sich in beiden Strängen des Akzeptorstammes je ein Hexanucleotid, während das dritte Bestandteil des Extraarmes ist. Da die SNN im Bereich eines Hexanucleotids spaltet und dabei die tRNA um etwa 7 Nucleotide verkürzt, kann die Nuclease nur einen Strang des Akzeptorstammes angreifen, und nicht beide.

Zu demselben Ergebnis kommt man, wenn im Verlauf der Spaltung die Reaktionsprodukte mit einer zweiten Methode weiter untersucht werden. Bei der Anilinspaltung in der Anticodonschleife (29) bilden sich aus der tRNA^{Phe} die Fragmente Phe 1 - 36 und Phe 38 - 76, die im verwendeten Gel (Abb. 2e) nicht getrennt werden. Eines dieser Fragmente entsteht auch bei der Anilinspaltung des Fragments 69 N, während anstelle des anderen die kürzeren Fragmente 32 N (etwa 15 %) und 31 N (etwa 85 %) auftreten (Abb. 2e, f). Die SNN spaltet demnach nur in einem Strang des Akzeptorstammes. Daß dies der CCA-Strang ist, die Fragmente 32 N und 31 N also aus dem Fragment Phe 38 - 76 entstehen, zeigt ein anderer Versuch, der mit einem besser trennenden Gel ausgewertet wird. Verfolgt man den Abbau einer in der Anticodon-

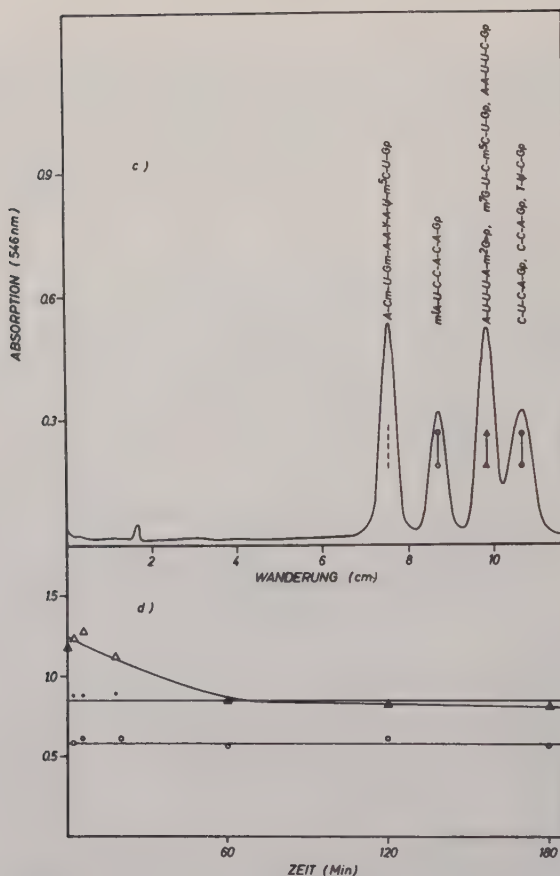
Abbildung 2: Spaltung der tRNA^{Phe} mit SNN. 12 A₂₆₀-Einheiten tRNA^{Phe} und 40 Einheiten SNN werden in 1.2 ml Standardpuffer bei 37°C inkubiert.



a) Reaktionsprodukte nach 60 Min. Inkubation. Densitogramm der elektrophoretischen Trennung im 16 %igen Gel (18°C, 0,5 cm Tasche) eines Aliquots von 0,05 A₂₆₀-Einheiten.

b) Kinetik der Spaltung

Das Prinzip der Auswertung ist in Kapitel 5.1.2 beschrieben. Die Symbole entsprechen denen in Teil a) dieser Abbildung.

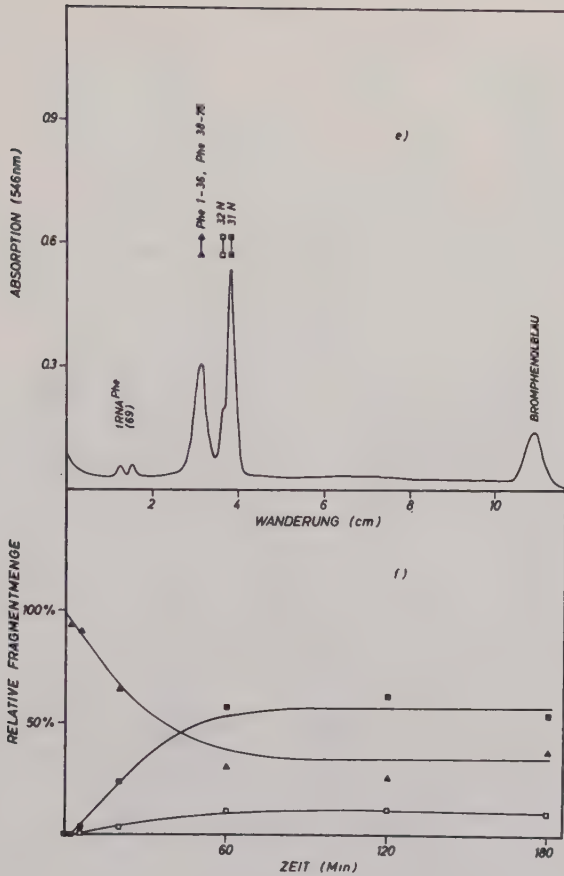


c) Totalspaltung der Reaktionsprodukte mit T1-RNase nach 60 Min. Inkubation.

Densitogramm der elektrophoretischen Trennung der Oligonucleotide im 16 %igen Gel (18°C, 0.5 cm Tasche). Die Zuordnung der einzelnen Gipfel ist durch Referenznucleotide gesichert. Die Symbole entsprechen denen in Abbildung 3.

d) Auswertung der Spaltkinetik mit SNN durch Analyse der Reaktionsprodukte mit Hilfe der Totalspaltung durch T1-RNase.

Im Verlauf der Reaktion werden Aliquots mit T1-RNase total gespalten. Die Menge der dabei entstehenden und im Gel anfärbaren Oligonucleotide wird auf die Menge des Dodecanucleotids (----) bezogen und gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Die Symbole entsprechen denen in Teil c) dieser Abbildung.



e) Anilinspaltung (29) der Reaktionsprodukte nach 60 Min. Inkubation.

Densitogramm der elektrophoretischen Trennung der dabei entstehenden Fragmente im 16 %igen Gel (18°C, 1 cm Tasche).

f) Auswertung der Spaltkinetik mit SNN durch Analyse der Reaktionsprodukte mit Hilfe der Anilinspaltung.

Im Verlauf der Reaktion werden Aliquots mit Anilin bei pH 3.0 - 3,5 gespalten. Die Menge der dabei entstehenden Fragmente ist gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Die Fläche unter dem Gipfel der Fragmente Phe 1 - 36 und Phe 38 - 76 zu Beginn der Spaltung ist 100 %. Die Symbole entsprechen denen in Teil e) dieser Abbildung.

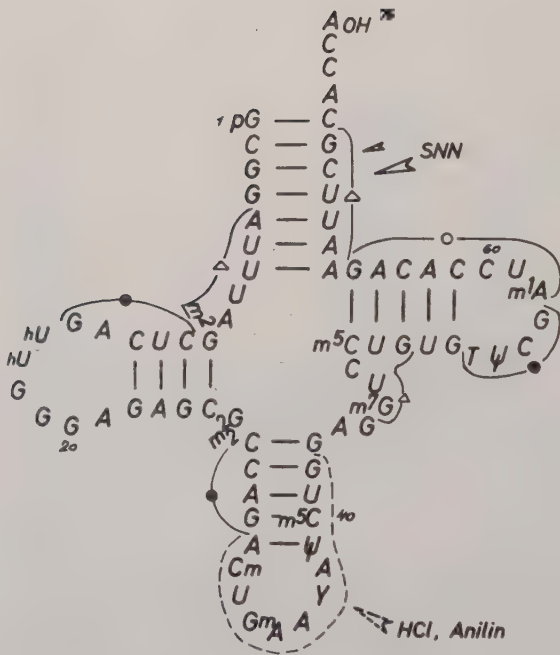


Abbildung 3: Kleeblattmodell der tRNA^{Phe} (30)

Die Klammern zeigen die Lage der Oligonucleotide, die bei einer Spaltung mit T1-RNase entstehen, und die im analytischen Gel nachgewiesen werden können. Die Symbole entsprechen denen in Abbildung 2c). Gleiches Symbol bedeutet, daß diese Oligonucleotide im Gel in einer Bande laufen. Die Stelle der Anilinspaltung (29) ist mit einem gestrichelten Pfeil gekennzeichnet. Die Stelle der Spaltung durch SNN ist ebenfalls durch Pfeile angedeutet.

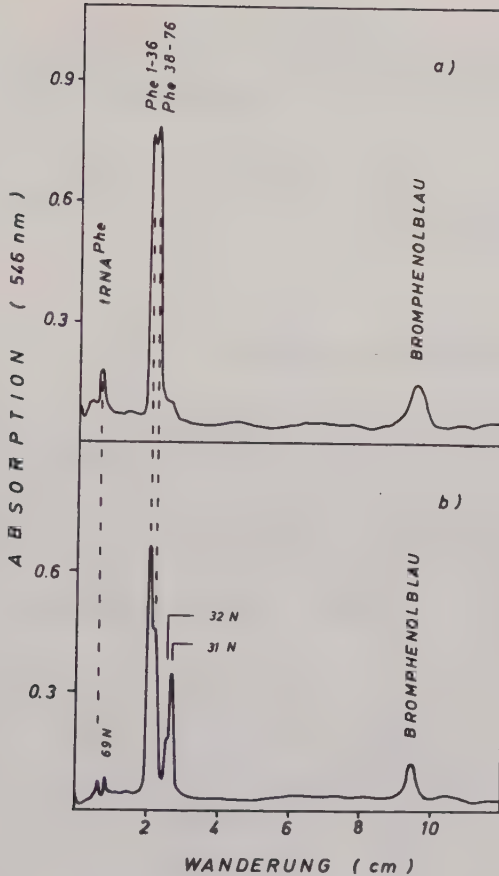


Abbildung 4: Spaltung eines äquimolaren Gemisches aus den Fragmenten Phe 1 - 36 und Phe 38 - 76 mit SNN

2.6 A₂₆₀-Einheiten des Fragmentgemisches werden mit 5.4 Einheiten SNN in 0.05 ml Standardpuffer bei 20°C inkubiert. Aliquots von 0.2 A₂₆₀-Einheiten zeigen im 17.5 %-igen Gel (40°C, 1 cm Tasche) die Zusammensetzung der Spaltprodukte.

a) Densitogramm der elektrophoretischen Trennung eines Aliquots zu Beginn der Reaktion.

Die Zuordnung der Gipfel erfolgte durch Referenzsubstanzen.

b) Densitogramm der elektrophoretischen Trennung eines Aliquots nach 60 Min. Inkubation.

schleife durch Anilin gespaltenen tRNA^{Phe}(HCl) mit einer Serie von Densitogrammen, von denen zwei in Abbildung 4 dargestellt sind, so sieht man, daß erst das Fragment Phe 38 - 76 verkürzt wird, bevor sich die Menge des Fragments Phe 1-36 ändert.

Damit ist gezeigt, daß die SNN bei der Reaktion mit tRNA^{Phe} etwa 7 Nucleotide vom CCA-Ende abspaltet. Eine Oligonucleotidanalyse (Kapital 2.1.3) bestätigt diesen aus Spaltmustern gezogenen Schluß.

2.1.2 Präparative Darstellung des Fragments Phe 1 - 69/70

80 A₂₆₀-Einheiten tRNA^{Phe} und 300 Einheiten SNN werden 180 Min. bei 37°C in 7.2 ml Standardpuffer inkubiert. Die Reaktion wird durch Erhitzen auf 70°C (2 Min.) mit 0,7 ml Phenol gestoppt. Nach Abzentrifugieren des denaturierten Proteins und Verdünnen auf das Fünffache werden die Reaktionsprodukte an DEAE-Cellulose getrennt (Abb. 5). Die Gipfel A bis E zeigen, daß bei der Reaktion ein Gemisch von Oligonucleotiden entsteht. Ein Versuch, die einzelnen Oligonucleotide zu analysieren, führte zu keinem Erfolg.

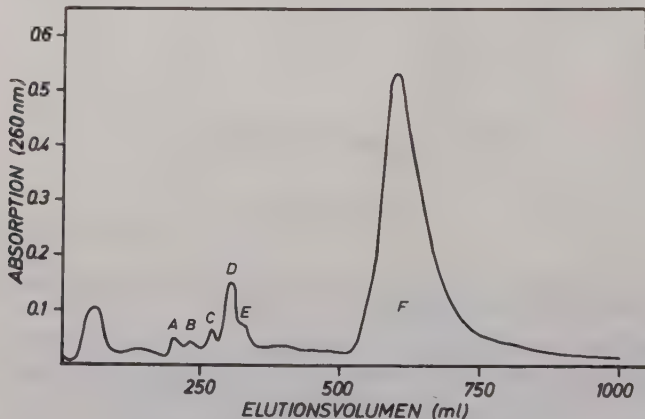


Abbildung 5: Trennung des Fragments Phe 1 - 69/70 von Oligonucleotiden mit einer DEAE-Cellulose-Säule

Säulenmaße: 1 x 25 cm; Gradient: 1000 ml 0.01 - 1.0 M
Ammoniumcarbonat, pH 8.3; Fraktionsgröße: 5 ml.

Das Material im Gipfel F gibt nach Dialyse gegen Wasser und Einengen im Rotationsverdampfer eine Bande im analytischen Gel und ist reines Fragment Phe 1 - 69/70.

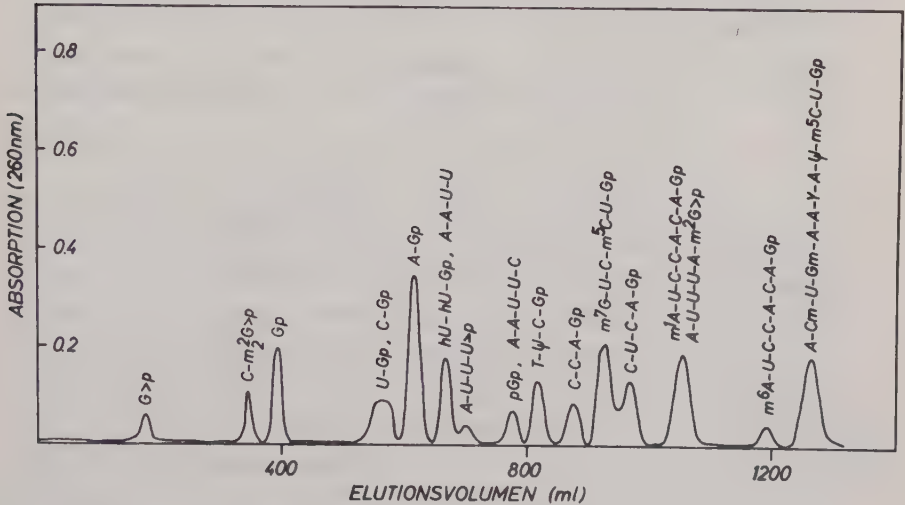


Abbildung 6: Elutionsprofil der Oligonucleotide von 45 A₂₆₀-Einheiten des Fragments Phe 1 - 69/70 nach vollständiger Spaltung mit T1-RNase

Säulenmaße: 0,6 x 100 cm; Gradient: 1700 ml 0,01 M Tris-HCl, pH 7,5, 7 M Harnstoff, 0,01 - 0,3 M NaCl; Fraktionsgröße: 3 ml.

2.1.3 Oligonucleotidanalyse des Fragments Phe 1 - 69/70

Ein Elutionsprofil der Oligonucleotide nach vollständiger Spaltung mit T1-RNase zeigt Abbildung 6. Beim Vergleich mit dem entsprechenden Spaltmuster der tRNA^{Phe} (31) sieht man einige neue Gipfel.

Die Oligonucleotide, die bei der Spaltung der tRNA^{Phe} mit T1-RNase entstehen, tragen immer am 3'-Ende ein Phosphat und sind dadurch gegen Schlangengift-PDE re-

Tabelle 1: Oligonucleotidanalyse des Fragments Phe 1 - 69/70

Die Extinktionskoeffizienten sind aus der Literatur übernommen (31) oder durch Vergleich mit ähnlichen Oligonucleotiden abgeschätzt. Von den Absorptionsspektren ist die Wellenlänge im Maximum angegeben, und zwar bei pH 7 (erste Zahl) und pH 2 (zweite Zahl). Die Nucleoside und Nucleotide wurden im System A getrennt (weiteres siehe Kap. 5.9).

Spaltprodukt	A ₂₆₀ Einh.	ϵ	Mol pro Mol CUCAGp	R _{Up}	$\lambda_{\max}$	PME/PDE	PDE
G > p	0,86	11.4	0,97	0,56	255/258	G	-
C-m ₂ ² G > p	1,12	20	0,72	0,51	262/270	C, m ₂ ² G	-
Gp	3,44	11.4	3,85	0,54	254/258	G	-
C-Gp	1,29	17.8	1,04	0,42	256/275	C, G	-
U-Gp	1,79	20	1,14	0,88	255/258	U, G	-
A-Gp	7,98	25	4,07	0,52	258/258	A, G	-
hU-hU-Gp	0,99	11.4	1,11	1,13	254/258	-	-
A-A-U-U	2,59	43	0,77	0,38	259/259	-	$\frac{pU}{pA+A} = 1,1$
pGp	0,58	11.4	0,66	1,20	255/258	-	-
A-U-U-U > p	1,15	42	0,35	1,22	260/260	$\frac{U}{A} = 2,2$	resist.
A-A-U-U-C	0,82	48	0,22	0,48	262/265	-	$\frac{pU+pC}{pA+A} = 1,6$
T-Ψ-C-Gp	3,10	34	1,14	0,98	261/266	-	-
C-C-A-Gp	2,08	37	0,73	0,50	260/268	-	-
m ⁷ G-U-C-m ⁵ C-U-Gp	5,20	57	1,16	0,76	258/262	-	-
C-U-C-A-Gp	3,52	47	1,00	0,64	258/261	A, G, U, C	-
m ¹ A-U-C-C-A-C-A-Gp	4,30	71	0,78	0,35	259/261	-	-
A-U-U-U-A-m ² G > p	1,84	66	0,36	0,78	257/257	-	-
m ⁶ A-U-C-C-A-C-A-Gp	0,88	71	0,16	} im 16 %igen Gel identifiziert			
A-Cm-U-Gm-A-A- Y-A-Ψ-m ⁵ C-U-Gp	5,40	106	0,66				

sistent (16). Die einzige Ausnahme dabei ist das endständige C-A-C-C-A. An der Spaltstelle der SNN entsteht hingegen eine 3'-Hydroxylgruppe (13), und das entsprechende Oligonucleotid aus einer Spaltung mit T1-RNase kann mit Schlangengift PDE abgebaut werden. Dies ist ein wesentlicher Gesichtspunkt bei der Identifizierung der Oligonucleotide. Wichtig dafür ist natürlich, daß die Schlangengift-PDE frei von Phosphomonoesterase (PME) ist. Wie Kontrollversuche mit ApGp zeigen, ist dies der Fall.

Die Ergebnisse der Oligonucleotidanalyse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Der pG-Teil des Akzeptorstammes ist intakt, da die Sequenz pG-C-G-G-A-U-U- vollständig im Fragment enthalten ist. (Daß weniger als 1 Mol pGp pro Mol Fragment gefunden wird, ist wahrscheinlich auf eine geringe PME-Verunreinigung der T1-RNase oder der SNN zurückzuführen). Die Sequenz C-A-C-C-A fehlt vollkommen, und anstelle des Hexanucleotids A-A-U-U-C-Gp findet man 77 % A-A-U-U und 22 % A-A-U-U-C. Es fehlen demnach die Nucleotide 70-76 bzw. 71-76, und das Fragment erhält die Bezeichnung Phe 1-69/70.

2.2 Spaltung der tRNA^{Tyr} mit SNN

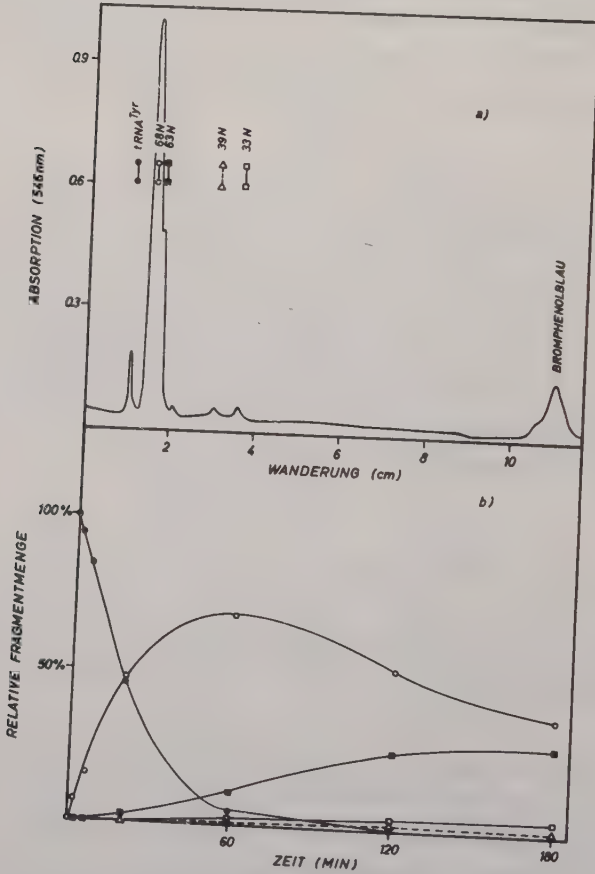
Die Auswertung von Spaltmustern in analytischen Gelen (Abb. 7) gibt einen guten Einblick in das Verhalten der tRNA^{Tyr} bei der Reaktion mit SNN.

Die tRNA^{Tyr} wird zunächst zu einem Fragment abgebaut, das aus ungefähr 68 Nucleotiden besteht, also etwa 10 Nucleotide kürzer ist als die tRNA. Aus diesem Fragment 68 N werden im späteren Verlauf der Reaktion etwa weitere 5 Nucleotide abgespalten, und es entsteht das Fragment 63 N (Abb. 7a, b). Da beide Fragmente im Harnstoff-Gel je eine Bande ergeben, bestehen sie aus je einer Nucleotidkette. Die SNN spaltet daher auch in der tRNA^{Tyr} im Akzeptorstamm.

In den ersten 60 Min. der Reaktion haben über 95 % der tRNA^{Tyr} mit der Nuclease reagiert (Abb. 7b). Untersucht man im Verlauf dieser Zeit die Reaktionsprodukte,

Abbildung 7: Spaltung der tRNA^{Tyr} mit SNN.

10 A₂₆₀-Einheiten tRNA^{Tyr} und 100 Einheiten SNN werden in 1.25 ml Standardpuffer bei 37°C inkubiert.

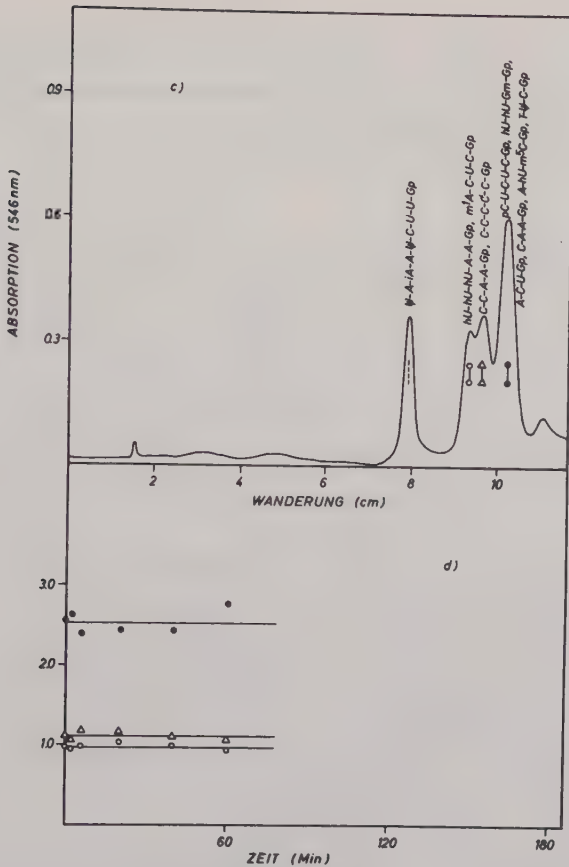


a) Reaktionsprodukte nach 60 Min. Inkubation.

Densitogramm der elektrophoretischen Trennung im 16 %igen Gel (18°C, 0.5 cm Tasche) eines Aliquots von 0.08 A₂₆₀-Einheiten.

b) Kinetik der Spaltung

Das Prinzip der Auswertung ist in Kap. 5.1.2 beschrieben. Die Symbole entsprechen denen in Teil a) dieser Abbildung.



c) Totalspaltung der Reaktionsprodukte mit T1-RNase nach 60 Min. Inkubation.

Densitogramm der elektrophoretischen Trennung der Oligonucleotide im 16 %igen Gel (18°C, 0.5 cm Tasche). Die Zuordnung der einzelnen Gipfel ist durch Referenz-nucleotide gesichert. Die Symbole entsprechen denen in Abbildung 8.

d) Auswertung der Spaltkinetik mit SNN durch Analyse der Reaktionsprodukte mit Hilfe der Totalspaltung durch T1-RNase.

Im Verlauf der ersten 60 Min. der Kinetik werden Aliquots mit T1-RNase total gespalten. Die Menge der dabei entstehenden und im Gel anfärbbaren Oligonucleotide wird auf die Menge des Nonanucleotids (---) bezogen und gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Die Symbole entsprechen denen in Teil c) dieser Abbildung.

2.3 Spaltung der tRNA^{Ser}_{II} mit SNN

Auch die tRNA^{Ser} verhält sich zu Beginn der Reaktion ähnlich wie tRNA^{Phe} und tRNA^{Tyr}. Es entsteht ein um etwa 6 Nucleotide kürzeres Fragment (Abb. 9a), das aber nicht sehr resistent gegen SNN ist, denn sein Anteil am Gemisch der Spaltprodukte ist maximal 40 % (Abb. 9b).

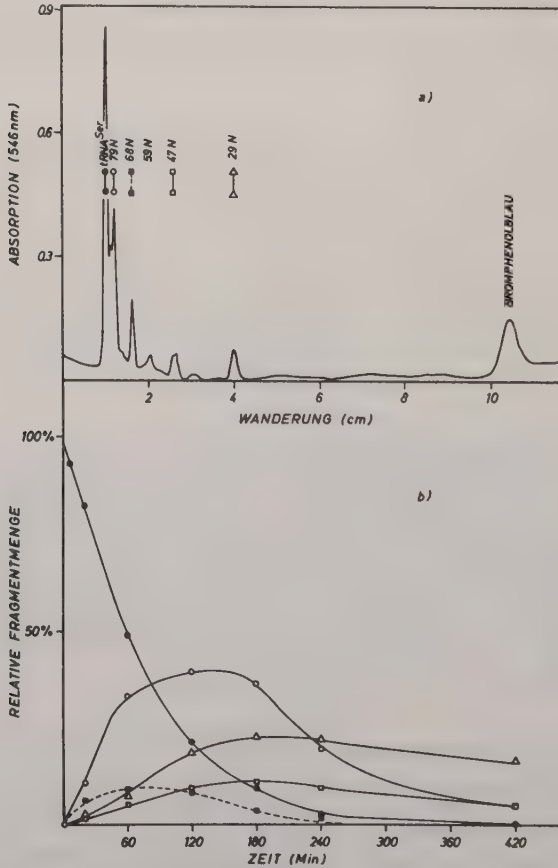
Ein sehr interessantes Verhalten zeigt das Fragment 68 N im Verlauf der Kinetik (gestrichelte Kurve in Abb. 9b). Es kann nicht aus dem Fragment 79 N entstehen, da es bereits nach 60 - 80 Min. seine maximale Konzentration erreicht hat. Entstände es aus dem Fragment 79 N, so müßte seine Konzentration so lange zunehmen, wie die des Fragments 79 zunimmt, das heißt mindestens 140 Min. lang. Das Fragment 68 N bildet sich demnach direkt aus der tRNA. Das kann entweder durch eine Spaltung in der hU-Schleife oder in der TΨC-Schleife geschehen.

Betrachtet man Länge und Konzentration der anderen Fragmente, so ist keine Kombination denkbar, die auf eine Spaltung in der Anticodonschleife hinweist. Es müßten Fragmente von 50 und 30 Nucleotiden entstehen mit einem Flächenverhältnis der entsprechenden Gipfel von etwa 5 zu 3. Die Menge des Fragments 47 N ist im Verlauf der Kinetik aber immer nur halb so groß wie die des Fragments 29 N (Abb. 9b). Wahrscheinlich bilden sich daher diese Fragmente aus der tRNA^{Ser} oder dem Fragment 79 N durch Abspaltung von kleinen Oligonucleotiden.

Untersucht man die Produkte der Reaktion von tRNA^{Ser} mit SNN wiederum durch Totalspaltung mit T1-RNase, so kann man 2 der dabei entstehenden Oligonucleotide im analytischen Gel gut trennen (Abb. 9c). Der Gehalt an diesen beiden Oligonucleotiden nimmt im Verlauf der Spaltung ab. Das Mengenverhältnis ändert sich aber kaum (Abb. 9d). Das bedeutet, daß der Bereich der Nucleotide 36 bis 45 des Anticodonstammes und der Anticodonschleife ähnlich resistent gegen die SNN ist wie der pG-Teil des Akzeptorstammes (Abb. 10), und das in großer Menge entstehende Fragment 79 N sollte daher durch eine Spaltung im CCA-Teil des Akzeptorstammes gebildet werden.

Abbildung 9: Spaltung der tRNA^{Ser}_{II} mit SNN.

12 A₂₆₀-Einheiten tRNA^{Ser} und 120 Einheiten SNN werden in 1.6 ml Standardpuffer bei 37°C inkubiert.

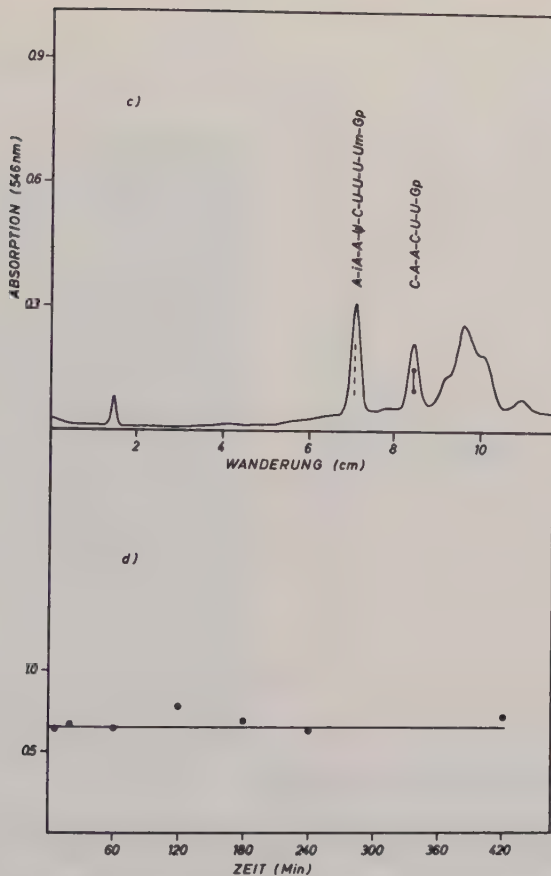


a) Reaktionsprodukte nach 60 Min. Inkubation.

Densitogramm der elektrophoretischen Trennung im 16 %igen Gel (18°C, 0.5 cm Tasche) eines Aliquots von 0.075 A₂₆₀-Einheiten.

b) Kinetik der Spaltung

Das Prinzip der Auswertung ist in Kapitel 5.1.2 beschrieben. Die Symbole entsprechen denen in Teil a) dieser Abbildung.



c) Totalspaltung der Reaktionsprodukte mit T1-RNase nach 60 Min. Inkubation.

Densitogramm der elektrophoretischen Trennung der Oligonucleotide im 16 %igen Gel (18°C, 0.5 cm Tasche). Die Zuordnung der Gipfel ist durch Referenzsubstanzen gesichert. Die Symbole entsprechen denen in Abbildung 10.

d) Auswertung der Spaltkinetik mit SNN durch Analyse der Reaktionsprodukte mit Hilfe der Totalspaltung durch T1-RNase.

Im Verlauf der Reaktion werden Aliquots mit T1-RNase total gespalten. Die Menge C-A-A-C-U-U-Gp wird auf die Menge des Decanucleotids bezogen und gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Die Symbole entsprechen denen in Teil c) dieser Abbildung.

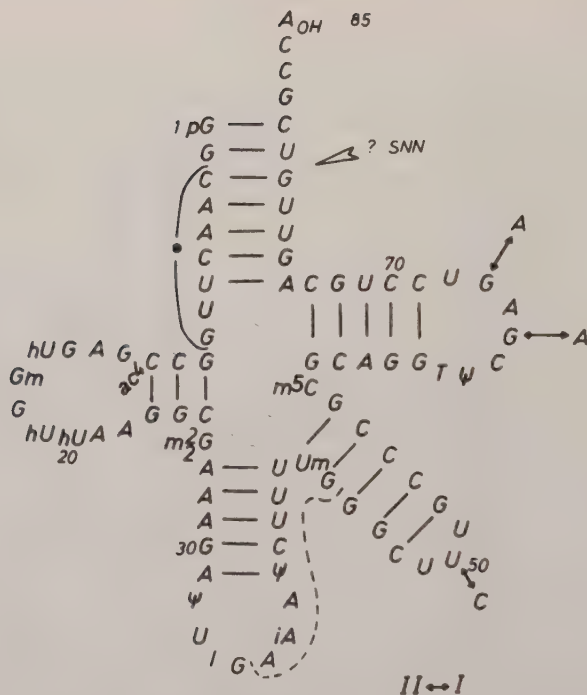


Abbildung 10: Kleeblattmodell der tRNA^{Ser}_{I+II} (9)

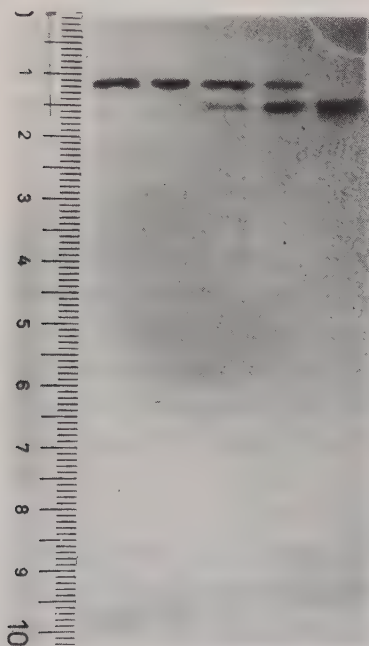
Die Klammern zeigen die Lage der beiden größten Oligonucleotide, die bei einer Spaltung der tRNA^{Ser}_{II} mit T1-RNase entstehen und die im analytischen Gel gut getrennt werden.

Die Symbole entsprechen denen in Abbildung 9c. Die Stelle, an der wahrscheinlich die SNN primär spaltet, ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

2.4 Spaltung weiterer tRNAs mit SNN

Andere Substrate wie tRNA^{Phe}_{Hefe} (HCl), tRNA^{Val}_{Hefe} und tRNA^{Phe}_{Weizen} (Abb. 11) reagieren mit SNN ähnlich wie tRNA^{Phe}_{Hefe} (Abb. 2a, b), das heißt, die tRNA wird nur um ein paar Nucleotide verkürzt.

Abbildung 11: Spaltung der tRNA^{Phe}_{Weizen} mit SNN.



0,23 A₂₆₀-Einheiten tRNA und 8 Einheiten SNN werden in 0,32 ml Standardpuffer bei 37°C inkubiert. Aliquots von 0,036 A₂₆₀-Einheiten werden zu bestimmten Zeiten entnommen und im 16 %igen Gel (18°C, 0,5 cm Tasche) untersucht. Die Fotografie des Geles zeigt die elektrophoretische Auftrennung der Reaktionsprodukte nach (von links nach rechts) 0, 2, 6, 20, 120 Min. Inkubation. Der Maßstab gibt die Wanderung des Bromphenolblau (9,5 - 9,8 cm) und der Fragmente an.

2.5 Akzeptoraktivität für Aminosäuren im Verlauf der Spaltung mit SNN

Die Beladbarkeit der tRNA^{Phe}, tRNA^{Tyr} und tRNA^{Ser} und ihrer Fragmente mit den entsprechenden Aminosäuren nimmt im Verlauf der Reaktion schnell ab. Diese Abnahme entspricht genau der Flächenabnahme der tRNA-Gipfel in Abbildung 2b, 7b und 9b. Das bedeutet, daß keines der entstehenden Fragmente und keine Fragmentkombination mit Aminosäure beladbar ist, und ist ein weiterer Hinweis darauf, daß die SNN sofort den CCA-Teil des Akzeptorstammes angreift.

2.6 Diskussion der Ergebnisse hinsichtlich der Spezifität der SNN und der Struktur der tRNA

Die Nuclease aus Schafsniere ist durch Versuche mit DNA und synthetischen Polynucleotiden charakterisiert worden (13, siehe auch Einleitung zu Kap. 2). Sie ist eine Endonuclease und zeigt weder eine Basenspezifität noch eine Spezifität für Ribose oder Desoxyribose und spaltet allgemein Einzelstränge.

Unter diesem Gesichtspunkt überraschen die Ergebnisse, die mit den verschiedenen tRNAs erhalten werden (Kap. 2.1 bis 2.4). Die SNN spaltet dort vornehmlich in Doppelsträngen und nicht in Einzelsträngen, also anders als es nach den Versuchen mit Polynucleotiden erwartet wurde. Bei allen untersuchten tRNA-Spezies werden ausschließlich oder hauptsächlich vom Akzeptorstamm Oligonucleotide abgespalten. Der Ort dieser Spaltung liegt wie im Fall der tRNA^{Phe} (Kap. 2.1.3) mitten in einem doppelsträngigen Bereich.

tRNA^{Phe}_{Hefe} (Abb. 3), tRNA^{Tyr}_{Hefe} (Abb. 8), tRNA^{Ser}_{Hefe} (Abb. 10) und tRNA^{Val}_{Hefe} (33) enthalten nach ihren Kleeblattstrukturen ein G-U-Paar im Akzeptorstamm, während im Akzeptorstamm der tRNA^{Phe}_{Weizen} (34) die beiden nichtpaarenden Nucleoside G und A gegenüberliegen. Zwischen der Lage dieser Paare im Akzeptorstamm und der Größe der Fragmente, die bei der Primäerspaltung durch SNN entstehen, besteht eine gute Korrelation, wenn man annimmt, daß die SNN den CCA-Strang an diesen Stellen spaltet. Die Daten reichen aber nicht aus, um behaupten zu können, daß die Stellen einer Helix, in denen sich G und U bzw. G und A gegenüberliegen, ein spezifischer Angriffspunkt für die SNN sind.

Man kann die Ergebnisse aber auch damit erklären, daß der Akzeptorstamm und besonders das CCA-Ende, wie in vielen Modellen angenommen wird (6, 7; siehe auch Abb. 1b), ganz oder teilweise aus dem kompakten tRNA-Molekül herausragt, das Enzym sich nur hier anlagern kann und primär im CCA-Strang spaltet.

Die einsträngige Sequenz pG-C-G am 5'-Ende des Fragments Phe 1 - 69/70 (Abb. 3)

ist erstaunlicherweise gegen SNN resistent. Auch Kasai und Grunberg-Manago finden nach Spaltung unfractionierter tRNA und Analyse der Reaktionsprodukte durch Alkalispaltung (13) überwiegend pGp in den größeren Fragmenten. Der Anfang der tRNA-Ketten mit der Polarität $5' \rightarrow 3'$ scheint daher allgemein resistent gegen einen Angriff der SNN zu sein. Ob das an der Reststruktur der Fragmente liegt, oder am Enzym, kann nicht gesagt werden.

Endonucleasen wie T1-RNase, T2-RNase und Pankreas-RNase spalten tRNAs primär in der Anticodonschleife oder in der hU-Schleife (28, 35, 36). Diese Bereiche sind also exponierte Angriffstellen. In 5 S RNA spaltet SNN im Bereich der Nucleotide 41/42 (37); an dieser Stelle erfolgt auch der Primärangriff der T1-RNase (38). Die SNN spaltet aber bei der Reaktion mit tRNAs nicht oder nur in unbedeutendem Ausmaß (Kap. 2.1 bis 2.4) in den einsträngigen Bereichen des Kleeblattmodelles. Diese Schleifen sind vielleicht zu klein, oder besitzen eine andere Struktur als einsträngige DNA oder die C-reichen Schleifen im Komplex aus Poly-AC und Poly U. Kasai und Grunberg-Manago (13) weisen schon darauf hin, daß einsträngiges Poly A und Poly C, die durch Basenstapelung stabilisiert sind, langsamer durch SNN gespalten werden als das weniger strukturierte Poly U.

Wenn man die Basenstapelung in der Anticodonschleife der tRNA^{Phe} durch Abspaltung der Base Y (39) unterbricht, so sollte unter der Annahme, daß die dabei entstehende Aldehydgruppe der Ribose die SNN nicht beeinflusst, Spaltung an dieser Stelle erfolgen können. Man beobachtet aber keine Änderung des Spaltmusters. Selbst wenn nach Anilinbehandlung in der Anticodonschleife der tRNA^{Phe} ein Bruch vorliegt (29), spaltet die SNN außer im CCA-Strang in keinem der einsträngigen Bereiche an der Bruchstelle (vgl. Abb. 2e und 4b).

Aus diesen Ergebnissen muß man den Schluß ziehen, daß allein durch die Versuche mit Polynucleotiden (13) die Spezifität der SNN nicht eindeutig beschrieben werden kann. Eine genauere Aussage über die Spezifität wird vielleicht erst möglich sein, wenn die Tertiärstruktur der tRNAs bekannt ist.

3. Abbau von Transfer-Ribonucleinsäuren mit einer Exonuclease aus Schweinemilz

Heppel und Hilmoe (40) isolierten aus Milz eine Phosphodiesterase, die Dinucleotide zu Nucleosid-3'-Phosphaten abbaut (41). Die Spaltung der Phosphodiesterbindungen geschieht unabhängig vom Nucleosid, mit dem die Phosphorsäure verestert ist, und ohne einen cyclischen Diester als Zwischenstufe (42). Daß diese Phosphodiesterase aus Milz (Abkürzung: Milz-PDE) eine Exonuclease ist und Nucleotidketten am 5'-Ende beginnend schrittweise zu Mononucleotiden abbaut, wurde von Razzell und Khorana (15) entdeckt. Bei hoher Substratkonzentration kann das Enzym auch Nucleosid-3'-Phosphate auf 5'-Hydroxylgruppen übertragen. Dabei werden Oligonucleotide synthetisiert (15, 43).

Die Präparation einer vollständig endonucleasefreien Exonuclease aus Schweinemilz beschreiben Bernardi und Bernardi (44). Bernardi und Cantoni (45) untersuchen das Verhalten von $\text{tRNA}_{\text{Hefe}}^{\text{Ser}}$ bei der Reaktion mit dieser hochgereinigten Milz-PDE. Dabei finden sie, daß die Exonuclease auch am 5'-Ende phosphorylierte (native) tRNA^{Ser} abbaut, jedoch nach einem anderen Mechanismus als dephosphorylierte tRNA^{Ser} . Sie markieren das 3'-Ende der Substrate mit ^{14}C -Adenosin oder ^{14}C -Serin und verfolgen den Abbau zu Mononucleotiden durch Messung der säurelöslichen A_{260} -Einheiten. Das säurefällbare Material wird auf seine Akzeptoraktivität für Serin untersucht. Wenn phosphorylierte tRNA^{Ser} als Substrat benutzt wird, beobachten sie eine gute Korrelation zwischen dem Anstieg der Mononucleotidkonzentration und der Konzentration von ^{14}C -Adenosin im säurelöslichen Überstand. Auch die Abnahme der Akzeptoraktivität korreliert mit dem Abbau zu Mononucleotiden. Wenn 20 % der eingesetzten A_{260} -Einheiten tRNA^{Ser} säurelöslich geworden sind, ist auch die Akzeptoraktivität um 20 % gesunken. Das säurefällbare Material besteht also größtenteils aus intakter tRNA. Die Milz-PDE spaltet im ersten Schritt der Reaktion das pGp am 5'-Ende der tRNA^{Ser} ab. Die um ein Nucleotiddiphosphat verkürzte tRNA hat nun am 5'-Ende eine Hydroxylgruppe und ist dadurch ein viel besseres Substrat für die Exonuclease als die anderen phosphorylierten tRNA-Moleküle (15). Das entstan-

dene Fragment wird also erst zu Mononucleotiden abgebaut, bevor ein weiteres tRNA-Molekül gespalten wird.

Wenn dephosphorylierte und mit Serin veresterte tRNA^{Ser} als Substrat benutzt wird, beobachten die Autoren erst nach 80 %igem Abbau zu Mononucleotiden einen Anstieg der ¹⁴C-Serin-Konzentration im säurelöslichen Überstand. Und wenn 20 % der eingesetzten A₂₆₀-Einheiten dephosphorylierter tRNA^{Ser} säurelöslich geworden sind, ist die Akzeptoraktivität schon um 90 % gesunken. Nur ein kleiner Teil des säurefällbaren Materials ist demnach noch intakte tRNA. Sie erklären diese Beobachtungen damit, daß die Exonuclease sämtliche Fragmente, die beim Abbau von dephosphorylierter tRNA entstehen, etwa gleich gut weiterspaltet. Mit einer statistischen Streuung werden demnach alle Substratketten gleichmäßig verkürzt.

Nach diesen Ergebnissen erwarteten wir, daß bei sehr kurzer Einwirkung von Milz-PDE auf dephosphorylierte tRNA ein Gemisch entsteht, das neben intakter tRNA verschieden große Fragmente enthält, denen nach statistischen Gesetzen 1, 2, 3, 4... usw. Nucleotide vom 5'-Ende her fehlen. Es sollte dann mit Hilfe dieser Fragmente gelingen, eine Aussage darüber zu machen, welche Nucleotide des 5'-Endes einer tRNA für die Beladung mit der entsprechenden Aminosäure nötig sind.

Bernardi und Cantoni (45) hatten die Fragmente, die beim Abbau dephosphorylierter tRNA entstehen, nur mit Methoden untersucht, die keinen genauen Aufschluß über die Heterogenität gaben. Wir studierten deshalb zunächst die Zusammensetzung dieses Fragmentgemisches mit Hilfe der analytischen Gelelektrophorese. Dabei zeigte sich sehr schnell, daß die Milz-PDE dephosphorylierte tRNAs in einer anderen Weise abbaut, als wir es erwartet hatten.

3.1 Abbau von dephosphorylierter tRNA^{Phe}

Die Milz-PDE spaltet ein tRNA^{Phe}-Molekül durch 75 Teilschritte in 75 Nucleotide und 1 Nucleosid. Ist die Reaktionsgeschwindigkeit für jeden dieser Schritte annähernd

gleich? Verfolgt man den Abbau durch Messung des Anteils an säurelöslichen Nucleotiden, so ergibt sich eine stetige Zunahme. Beobachtet man parallel dazu die entstehenden Nucleotidketten mit Hilfe der analytischen Gelelektrophorese, so findet man kein heterogenes Gemisch allmählich kürzer werdender Fragmente, sondern nur ein paar Fragmente mit definierter Kettenlänge (Abbildung 12).

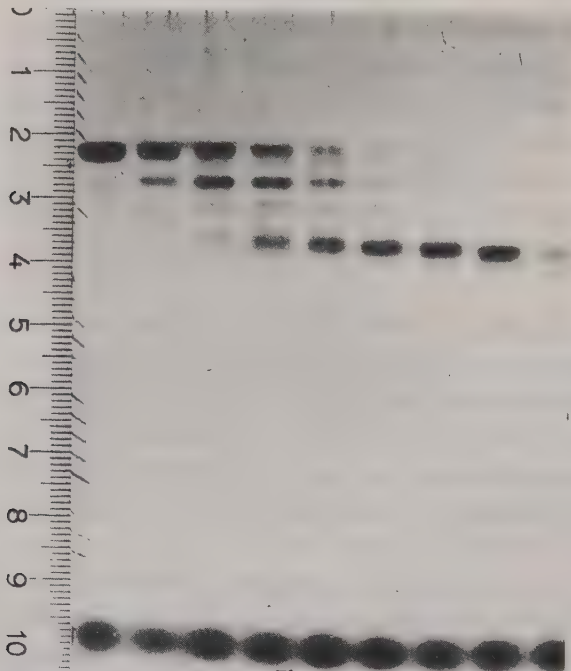


Abbildung 12: Abbau dephosphorylierter tRNA^{Phe} mit Milz-PDE und Trennung der Reaktionsprodukte im 12 %igen Gel.

1.8 A₂₆₀-Einheiten tRNA und 4.6 Einheiten Milz-PDE werden in 0.23 ml 75 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6.0, und 25 mM Ammoniumsulfat bei 37°C inkubiert. Aliquots von 0.08 A₂₆₀-Einheiten werden nach 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10 und 40 Min. entnommen und im Gel (4°C, 0.5 cm Tasche) untersucht. Der Maßstab gibt die Wanderung des Bromphenolblau (9.7 - 10.1 cm) und der Fragmente an.

Während einige Bereiche der tRNA sehr schnell abgebaut werden, benötigt die Abspaltung von Mononucleotiden an bestimmten Stellen eine viel höhere Aktivierungsenergie. Dadurch treten die Fragmente, die mit einer dieser "Stopstellen" beginnen, im Gemisch der Abbauprodukte in großen Konzentrationen auf. Gleiches gilt für die

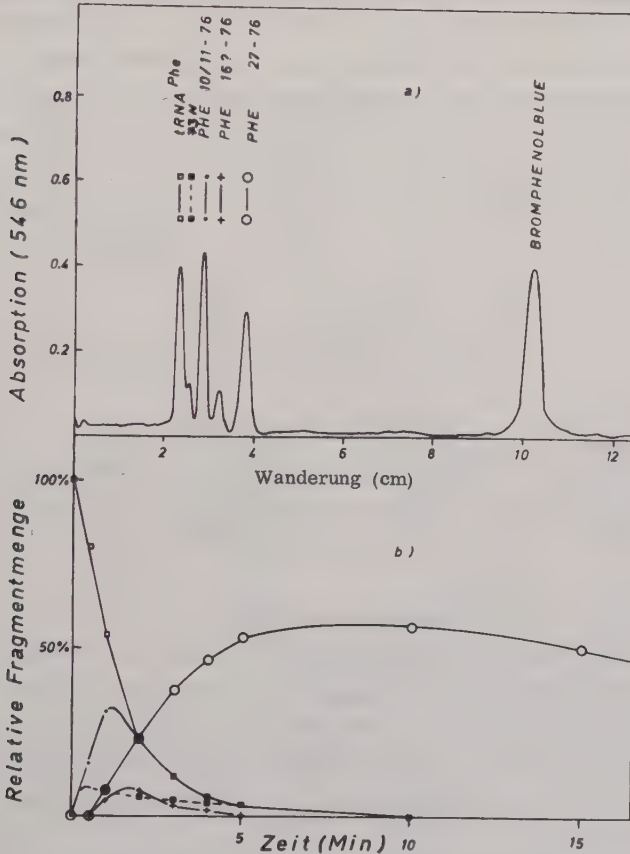


Abbildung 13: Abbau dephosphorylierter tRNA^{Phe} mit Milz-PDE (Quantitative Auswertung des analytischen Gels aus Abbildung 12).

- a) Densitogramm der elektrophoretischen Trennung der Reaktionsprodukte nach 2 Minuten Inkubation.
- b) Kinetik des Abbaus
Das Prinzip der Auswertung ist in Kap. 5.1.2 beschrieben. Die Symbole entsprechen denen in Teil a) dieser Abbildung.

Schlängengift-Phosphodiesterase (46), die bei einer 3'-Hydroxylgruppe beginnend Nucleinsäuren schrittweise zu Mononucleotiden abbaut (16).

Eine quantitative Auswertung (Abbildung 13) des Gels von Abbildung 12 zeigt, daß es schwache und starke Stopstellen gibt, und daß die maximale Konzentration kleiner Fragmente erst bei langen Inkubationszeiten erreicht wird. Dieser letzte Befund ist typisch für die Wirkungsweise der Milz-PDE (siehe auch Abb. 16 und Abb. 18).

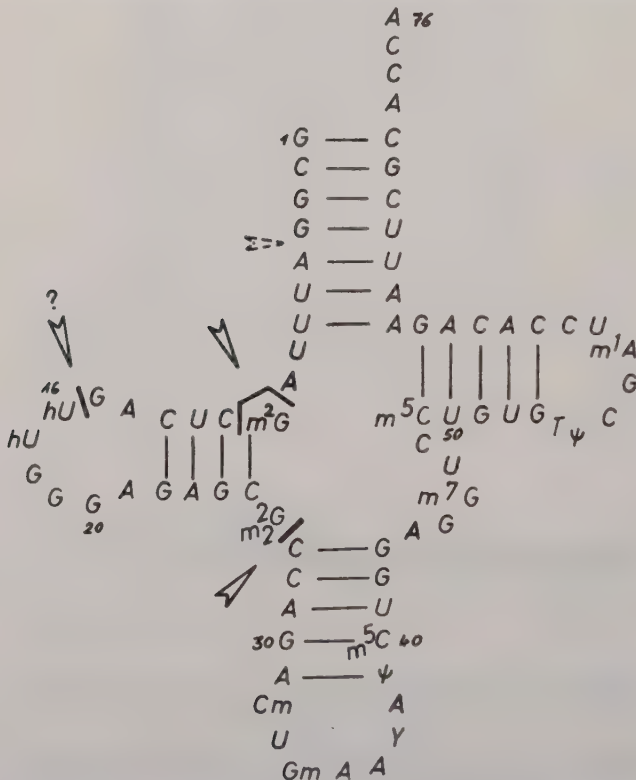


Abbildung 14: Kleeblattmodell der tRNA^{Phe} (30).

Die Pfeile kennzeichnen die Stopstellen für die Milz-PDE beim Abbau der dephosphorylierten tRNA^{Phe}. Für die Länge des Fragments 73 N, dessen Sequenz vom gestrichelten Pfeil bis zum CCA-Ende verläuft, gibt es außer einer Kettenlängenbestimmung aus dem R_B-Wert und einer Eichgeraden (Kap. 4, 3) keine analytischen Daten.

Die Frage, ob eine bestimmte Folge von Nucleotiden, einige der seltenen Nucleotide oder eine bestimmte Sekundärstruktur die Stopstellen bedingen, wird teilweise durch Analyse der Fragmente beantwortet (Kap. 3,10). Das Ergebnis ist in Abbildung 14 dargestellt.

Eventuell vorhandene Stopstellen zwischen dem Anticodon und dem CCA-Ende kann man bei diesem Versuch infolge des langsamen Abbaus des Fragments Phe 27-76 nicht beobachten. Man müßte von einem Substrat ausgehen, das etwas kürzer ist als das Fragment Phe 27-76. Im Zusammenhang mit Problemen des Abbaus von halben tRNA-Molekülen (Kap. 3,11.1) wird der Abbau des Fragments Phe 38-76 (siehe Abbildung 28a) beschrieben.

3.2 Abbau von dephosphorylierter tRNA^{Ser}_{I+II}

Auch bei Versuchen mit tRNA^{Ser} findet man im analytischen Gel mehrere scharfe Banden, die die Existenz von Stopstellen beweisen. Durch Analyse der entsprechenden Fragmente (Kapitel 3,10) kann die Lage einiger dieser Stopstellen bestimmt werden. Das Ergebnis ist in Abbildung 15 dargestellt.

Da die Milz-PDE als Ammoniumsulfatfällung aufbewahrt wird, befinden sich im Inkubationsgemisch Ammoniumionen. Bei Anwesenheit von Ammoniumionen reagiert die Milz-PDE an einigen Stopstellen langsamer als bei Abwesenheit von Ammoniumionen, und die entsprechenden Fragmente treten im Gemisch der Abbauprodukte in größeren Konzentrationen auf (Abbildung 16). Besonders groß ist dieser Effekt für die Fragmente Ser 9/11-85 und Ser 16?-85 (Abb. 16c, d).

Da die Aktivität der Milz-PDE bei der verwendeten Konzentration von Ammoniumionen nicht beeinflusst wird (42), muß dieser Effekt auf einer Strukturänderung oder Strukturstabilisierung an einigen Stellen der tRNA^{Ser} beruhen.

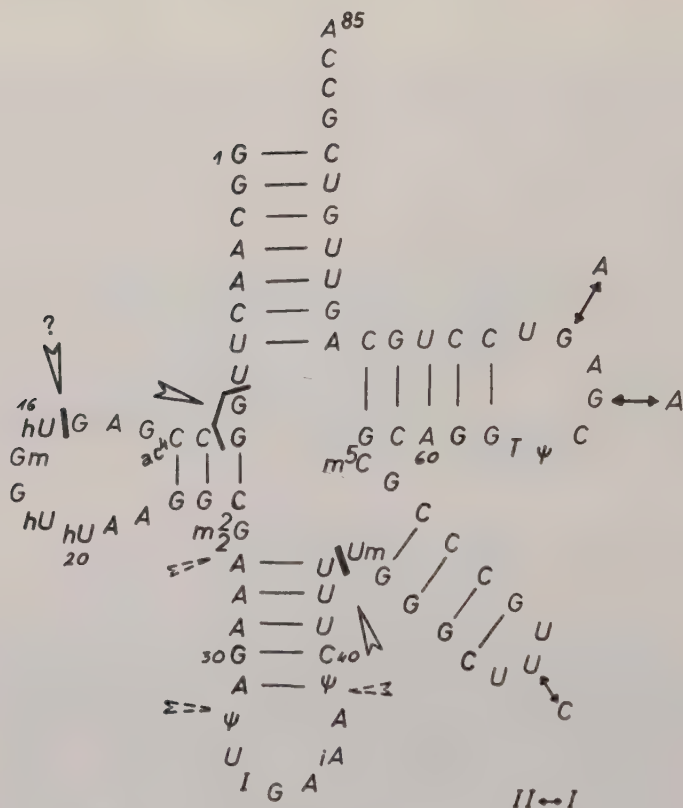


Abbildung 15: Kleeblattmodell der tRNA^{Ser}_{I+II} (9)

Die Pfeile zeigen die Stellen, an denen der Abbau durch Milz-PDE verlangsamt wird. Die gestrichelten Pfeile kennzeichnen Stopstellen, für die außer einer Kettenlängenbestimmung der entsprechenden Fragmente im 12 %igen und 16 %igen Gel (Kap. 4.3) keine anderen analytischen Daten vorliegen.

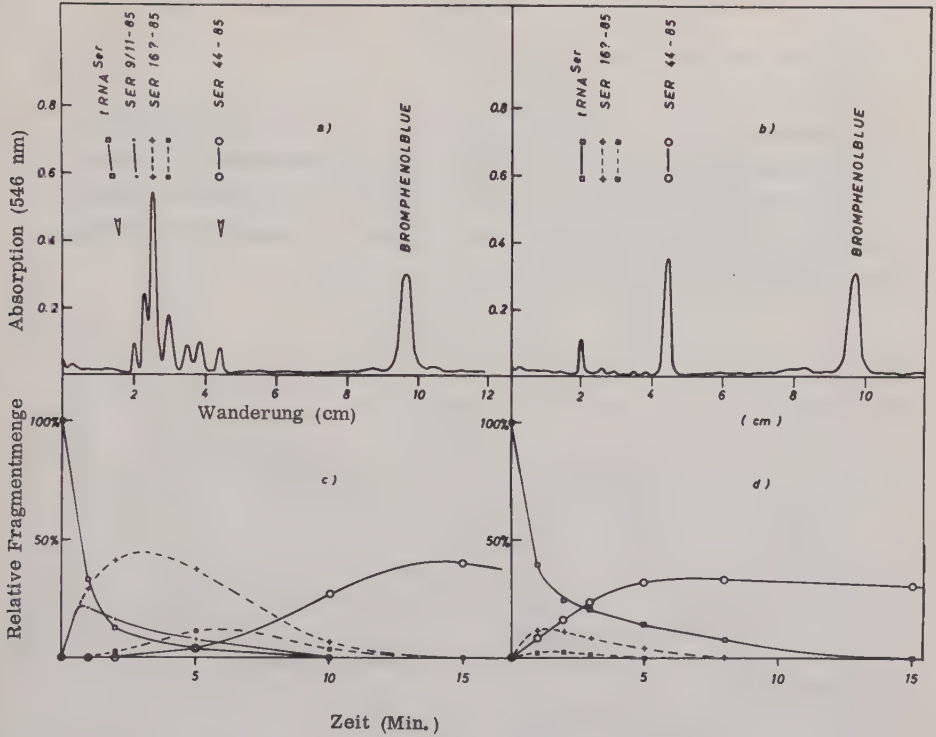


Abbildung 16: Einfluß der Ammoniumionen auf den Abbau dephosphorylierter tRNA^{Ser}_{I+II} durch Milz-PDE

4.4 A₂₆₀-Einheiten tRNA und 20 Einheiten Milz-PDE werden in 0.21 ml 100 mM Acetatpuffer, pH 6.2, mit (a, c) und ohne (b, d) 35 mM Ammoniumacetat, 15 mM Ammoniumsulfat, bei 37°C inkubiert.

a, b) Densitogramm der elektrophoretischen Trennung im 12 %igen Gel (4°C, 0.5 cm Tasche) eines Aliquots von 0.06 A₂₆₀-Einheiten nach 5 Min. Inkubation. (Bei Abwesenheit von Ammoniumionen wird das Fragment Ser 9/11-85 nur bei sehr kurzen Inkubationszeiten beobachtet.)

c, d) Kinetik des Abbaus

Das Prinzip der Auswertung ist in Kapitel 5.1.2 beschrieben. Die Symbole entsprechen denen in Teil a) bzw. b) dieser Abbildung.

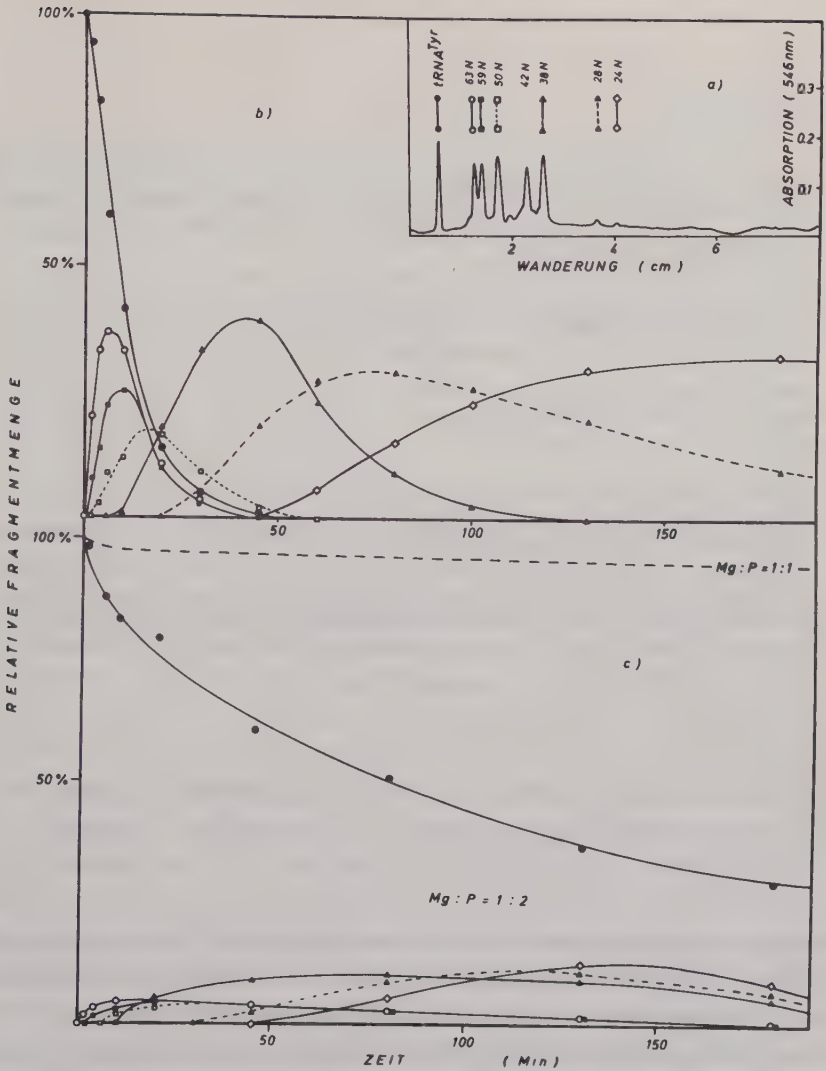


Abbildung 18: Einfluß der Mg^{++} -Konzentration auf den Abbau desphosphorylierter $tRNA^{Tyr}$ durch Milz-PDE

1.0 A₂₆₀-Einheiten tRNA und 1.0 Einheiten Milz-PDE werden in 0.2 ml 100 mM Acetatpuffer, pH 6.2, und 25 mM Ammoniumsulfat bei 37°C mit unterschiedlichen Mg^{++} -Konzentrationen inkubiert.

Zu Abbildung 18:

a) Densitogramm der elektrophoretischen Trennung im 16 %igen Gel (4°C , 1 cm Tasche) eines Aliquots von 0.05 A_{260} -Einheiten nach 20 Min. Inkubation bei Abwesenheit von Mg^{++} -Ionen. (Ein Fragment mit etwa 69 Nucleotiden wird nur bei kurzen Inkubationszeiten beobachtet.)

b) Kinetik des Abbaus bei Abwesenheit von Mg^{++} -Ionen.

Das Prinzip der Auswertung ist in Kapitel 5.1.2 beschrieben. Die Symbole entsprechen denen in Teil a) dieser Abbildung.

Wenn der Abbau bei einer Konzentration von 0.03 mM Magnesiumacetat (Verhältnis von Mg^{++} -Ionen zu Phosphatgruppen 1 : 20) durchgeführt wird, so ergibt sich für die Kinetik ein gleiches Bild.

c) Kinetik des Abbaus bei einer Konzentration von 0.3 mM Magnesiumacetat (Verhältnis von Mg^{++} -Ionen zu Phosphatgruppen 1 : 2).

Das Prinzip der Auswertung ist in Kapitel 5.1.2 beschrieben. Die Symbole entsprechen denen in Teil a) dieser Abbildung.

Die gestrichelte Linie im oberen Teil des Bildes entspricht der Flächenabnahme des tRNA-Gipfels in einer Serie von Densitogrammen, wenn bei einer Konzentration von 0.6 mM Magnesiumacetat (Verhältnis von Mg^{++} -Ionen zu Phosphatgruppen 1 : 1) inkubiert wird.

Eine ausgeprägte Magnesiumabhängigkeit der Aktivierungsenergie für die erste Spaltung im Akzeptorstamm zeigen die Versuche, die durch Abbildung 18 dargestellt sind.

Wenn jede Phosphatgruppe eines tRNA-Moleküls mit einem Mg^{++} -Ion reagieren kann, wird das 5'-Ende der Doppelhelix des Akzeptorstammes nicht abgebaut. Dies zeigt sich auch bei analogen Versuchen mit dephosphorylierter tRNA^{Ser}. Die Aktivität des Enzyms wird bei den verwendeten Mg^{++} -Konzentrationen nicht beeinflusst (42, 44). Man muß daher annehmen, daß Mg^{++} -Ionen einen Doppelstrang so stabilisieren, daß die Milz-PDE ihn nicht mehr abbauen kann.

Wenn nur jede zweite Phosphatgruppe einer tRNA mit einem Mg^{++} -Ion reagieren kann, treten dieselben Fragmente auf wie beim Abbau der tRNA^{Tyr} ohne Mg^{++} .

Ionen (Abb. 18a). Die Nucleotide des Akzeptorstammes eines tRNA-Moleküls werden wieder ohne Unterbrechung abgebaut. Die vorhandenen Mg^{++} -Ionen beeinflussen nur die Geschwindigkeit des Gesamtabbaus, indem sie an bestimmten Stellen der tRNA die Aktivierungsenergie für eine Spaltung erhöhen. Eine dieser Stellen ist das 5'-Ende des Akzeptorstammes, so daß bei geringer Mg^{++} -Konzentration ($Mg : P = 1 : 2$) die Konzentration der intakten tRNA wesentlich langsamer abnimmt als bei Abwesenheit von Mg^{++} -Ionen, wobei als weitere Folge die Reaktionsprodukte nur noch in geringen Konzentrationen auftreten können (Abb. 18b, c).

3.4 Variation der Abbaubedingungen

Wenn die Milz-PDE unter den bisher beschriebenen Bedingungen ($37^{\circ}C$, pH 6) mit dephosphorylierten tRNAs reagiert, so wird der Abbau an einigen Stellen verlangsamt (Kap. 3.1 - 3.3). Man kann versuchen, durch Variation der Abbaubedingungen den Komplex aus Nucleotidkette und Exonuclease derart zu beeinflussen, daß nicht nur der Abbau an den alten Stopstellen verlangsamt ist, sondern auch an anderen Stellen der tRNA. Ein Auftreten von solchen neuen Stopstellen wäre durch ein verändertes Muster der Banden im analytischen Gel zu erkennen. Zwei Beispiele dafür zeigt Abbildung 19.

Die Assoziationskonstante der Milz-PDE mit einigen Fragmenten, die beim Abbau des hU-Stammes und der hU-Schleife der tRNA^{Tyr} entstehen, ist bei $47^{\circ}C$ so erniedrigt, daß im analytischen Gel in den entsprechenden Bereichen mehr Gipfel beobachtet werden (Abb. 19a) als beim Abbau bei $37^{\circ}C$ (Abb. 18a). Durch die Änderung der Reaktionsbedingungen sind neue Stopstellen entstanden. Der gleiche Effekt tritt auf, wenn bei pH 3,9 inkubiert wird (Abb. 19b). Hier sind die zusätzlichen Gipfel und Schultern durch neue Stopstellen im hU-Stamm zu erklären.

Tabelle 2 gibt einen Überblick, in welchen Bereichen eines tRNA-Moleküls neue Stopstellen entstehen, wenn die Abbaubedingungen variiert werden. Interessant ist das unterschiedliche Verhalten der drei untersuchten tRNAs bei niedrigen pH-Werten

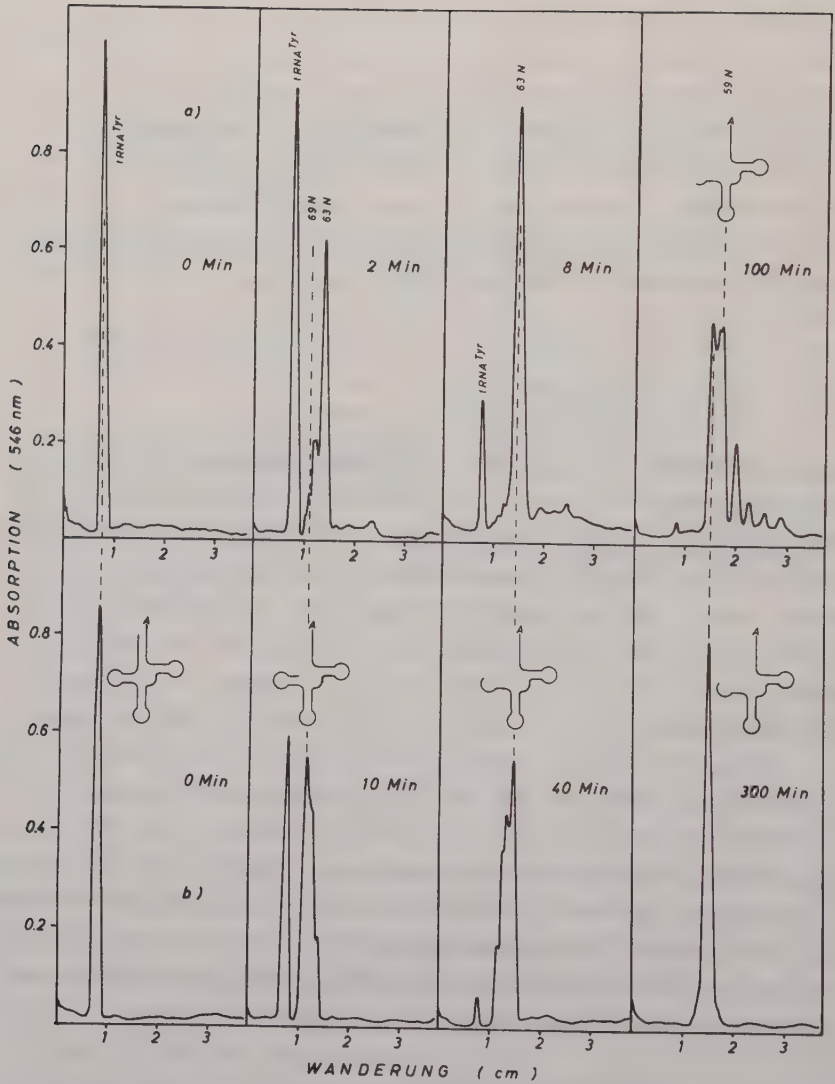


Abbildung 19: Einfluß der Temperatur und des pH-Wertes auf den Abbau desphosphorylierter tRNA^{Tyr} durch Milz-PDE.

Zu Abbildung 19:

Die Ausschnitte aus Densitogrammen zeigen die elektrophoretische Trennung im 16 %igen Gel (4°C, 0.5 cm Tasche) von je 0.03 A₂₆₀-Einheiten folgender Inkubationsgemische:

- a) 1.0 A₂₆₀-Einheiten tRNA und 1.0 Einheiten Milz-PDE in 0.2 ml 100 mM Acetatpuffer, pH 6.2, und 25 mM Ammoniumsulfat. Die Reaktionstemperatur ist 47°C.
 - b) 1.0 A₂₆₀-Einheiten tRNA und 1.0 Einheiten Milz-PDE in 0.2 ml 65 mM Succinatpuffer, pH 3.9, und 25 mM Ammoniumsulfat. Die Reaktionstemperatur ist 37°C.
-

und hohen Temperaturen (Tabelle 2b, e). Die neuen Stopstellen befinden sich in verschiedenen Regionen der tRNA-Struktur: bei der tRNA^{Tyr} im Bereich des hU-Stammes ungefähr zwischen Nucleotid 8 und Nucleotid 15 (siehe Abbildung 17), bei der tRNA^{Phe} im Übergang vom Akzeptorstamm zum hU-Stamm ungefähr zwischen Nucleotid 5 und Nucleotid 11 (siehe Abbildung 14) und bei der tRNA^{Ser} im Akzeptorstamm ungefähr zwischen Nucleotid 2 und Nucleotid 8 (siehe Abbildung 15).

Wenn dephosphorylierte tRNA^{Tyr} in 100 mM Acetatpuffer, pH 6.2, 25 mM Ammoniumsulfat und 1 % Phenol mit Milz-PDE bei 37°C inkubiert wird, entstehen dieselben Fragmente wie beim Abbau ohne Phenol (Abbildung 18a). Allerdings ist die Geschwindigkeit, mit der die tRNA abgebaut wird, um einen Faktor 100 bis 150 verlangsamt.

Tabelle 2: Neue Stopstellen, die durch Variation der Abbaubedingungen entstehen.

tRNA	$\frac{\text{PDE-Einheiten}}{\text{A}_{260}\text{-Einheiten}}$	Temperatur	Abbau	Neue Stopstellen
a) Tyr	1.0	5°C	-	
Tyr	1.0	47°C	+	} im hU-Stamm und in der hU-Schleife
Tyr	1.0	60°C	+	
Phe	1.8	5°C	-	
Phe	2.6	20°C	-	
Phe	20.0	47°C	+	keine
Ser	1.7	5°C	-	
Ser	2.6	20°C	+	keine
Ser	3.3	50°C	+	keine
b) Tyr	1.0	37°C	+	im hU-Stamm
Tyr	1.0	50°C	+	im hU-Stamm
Tyr	1.0	60°C	+	im hU-Stamm
Tyr	1.0	70°C	+	im hU-Stamm
Phe	20.0	47°C	+	} im Übergang vom Akzeptor zum hU-Stamm
Phe	8.5	54°C	+	
Ser	18.0	47°C	+	
c) Tyr	1.2	25°C	+	im hU-Stamm
Tyr	1.2	50°C	+	im hU-Stamm
Phe	1.2	25°C	+	?
Phe	1.2	50°C	+	?
Ser	1.2	25°C	-	
Ser	1.2	50°C	-	
d) Tyr	1.2	37°C	-	
Phe	1.2	37°C	-	
Ser	1.2	37°C	-	

Fortsetzung Tabelle 2:

tRNA	<u>PDE-Einheiten</u> A ₂₆₀ -Einheiten	pH-Wert	Abbau	Neue Stopstellen
e) Tyr	20.0	3.8	+	im hU-Stamm
Tyr	8.5	3.3	+	im hU-Stamm
Tyr	8.5	2.9	+	im hU-Stamm
Phe	8.5	3.8	+	} im Übergang vom Akzeptor- zum hU-Stamm
Phe	3.0	3.3	+	
Phe	3.0	2.9	+	
Ser	13.0	3.8	+	im Akzeptorstamm

Unter folgenden Bedingungen werden dephosphorylierte tRNAs mit Milz-PDE abgebaut:

- Bei verschiedenen Temperaturen in 100 mM Acetatpuffer, pH 6.2, und 25 mM Ammoniumsulfat.
- Bei verschiedenen Temperaturen in 65 mM Succinatpuffer, pH 3.9, und 25 mM Ammoniumsulfat.
- Bei verschiedenen Temperaturen in 10 mM Succinatpuffer, pH 3.6.
- Bei verschiedenen Temperaturen in 0.5 mM Acetatpuffer, pH 5.0.
- Bei verschiedenen pH-Werten in 50 mM Succinatpuffer und einer Temperatur von 50°C.

Ein "?" bedeutet, daß die Reaktion sehr schnell zum Stillstand kommt, und eine Zuordnung der entstehenden schwachen Banden in analytischen Gel nicht möglich ist.

3.5 Abbau von dephosphorylierter tRNA nach Behandlung mit Borhydrid

Durch Reduktion mit Borhydrid wird der Ring des 5,6-Dihydrouracil geöffnet, und es entsteht Ureidopropanol (47). Mit dieser Reaktion kann man tRNAs modifizieren (22, 47) und versuchen, damit den Abbau durch Milz-PDE zu beeinflussen.

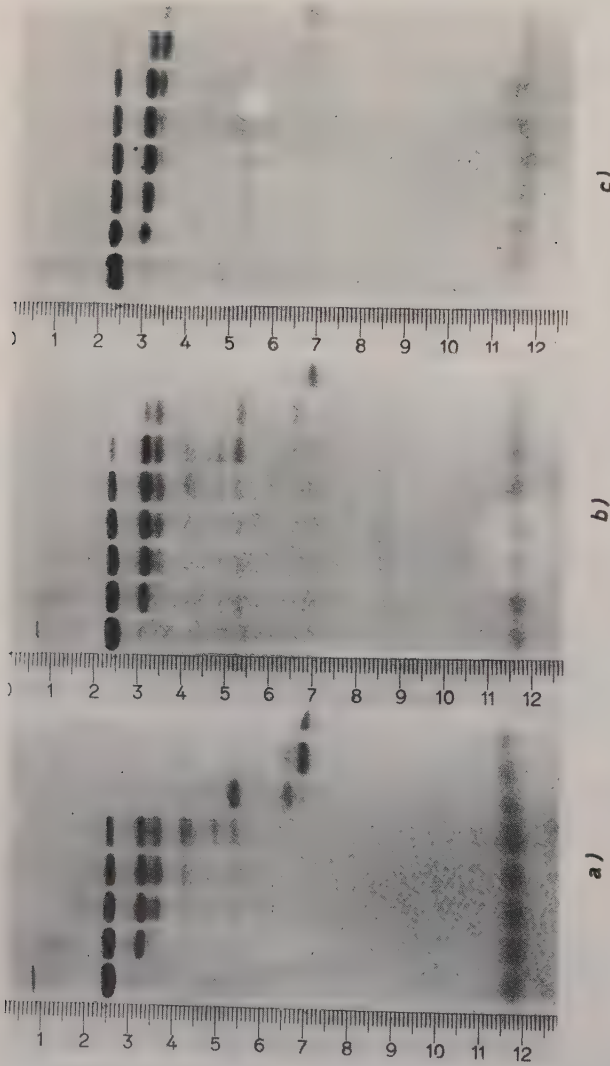


Abbildung 20: Einfluß einer BH_3 -Behandlung der dephosphorylierten tRNA^{Tyr} auf den Abbau durch Milz-PDE.

a) 1.6 A_{260} -Einheiten tRNA^{Tyr} , b) 0.8 A_{260} -Einheiten tRNA^{Tyr} + 0.9 A_{260} -Einheiten BH_3 -behandelter tRNA^{Tyr} und c) 1.8 A_{260} -Einheiten BH_3 -behandelter tRNA^{Tyr} werden mit 4.6 Einheiten Milz-PDE in 0.2 ml 75 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6.0 und 25 mM Ammoniumsulfat bei 37°C inkubiert. Aliquots von je 0.08 bis 0.09 A_{260} -Einheiten werden nach $0, 1, 2, 3, 5, 10, 20$ und 80 Minuten entnommen und im 12% igen Gel (4°C , 0.5 cm Tasche) untersucht. Der Maßstab gibt die Wanderung des Bromphenolblau ($11.5 - 11.7 \text{ cm}$) und der Fragmente an.

Ein entsprechender Vergleich mit unmodifizierter und modifizierter tRNA^{Tyr} ist in Abbildung 20 dargestellt. Die Banden der Fragmente, die beim Abbau der unmodifizierten tRNA (Abb. 20a) durch Stopstellen in der hU-Schleife entstehen, sind beim Abbau modifizierter tRNA (Abbildung 20c) noch nach wesentlich längeren Inkubationszeiten im Gel zu sehen. Gleiches gilt für analoge Versuche mit tRNA^{Ser} und tRNA^{Val}. Nach Umwandlung des Dihydrouridins in Ureidopropanolribosid sind die Stopstellen, die durch Dihydrouridin hervorgerufen wurden (Abb. 15, 17), wesentlich stärker geworden. Einen anderen Effekt bewirkt die Modifizierung mit Borhydrid bei tRNA^{Phe}. Nicht der Abbau der modifizierten Nucleotide 16 und 17 (Abb. 14) ist verlangsamt, sondern die Primäerspaltung im Akzeptorstamm.

3.6 Abbau von dephosphorylierter 5 S RNA aus E. coli durch Milz-PDE

Die 5 S RNA enthält im Unterschied zu tRNA keine seltenen Nucleotide (48). Sie ist daher ein interessantes Substrat, wenn man den Mechanismus des Abbaus durch Milz-PDE untersuchen will.

1.8 A₂₆₀-Einheiten dephosphorylierte 5 S RNA werden unter denselben Bedingungen, wie sie in der Bildlegende zu Abb. 12 beschrieben sind, abgebaut. Nach Trennung der Reaktionsprodukte im 12 %igen Gel beobachtet man viele schwache und einige stärkere Banden. Ein genaueres Bild der Kinetik gibt eine Auswertung der entsprechenden Densitogramme nach dem Prinzip, das in Kapitel 5.1.2 beschrieben ist. Danach erfordert wahrscheinlich der Abbau der ersten Nucleotide vom 5'-Ende eine weitaus größere Aktivierungsenergie (7 G-C Paare und 2 A-U Paare) als der weitere Abbau bis zum 3'-Ende der 5 S RNA. Darum ist die Menge der entstehenden Fragmente maximal 10 % der eingesetzten 5 S RNA-Menge und die Banden im Gel sind entsprechend schwach. Da der Abbau der 5 S RNA auch noch durch den Abbau vorhandener Verunreinigungen gestört wird, ist es sehr schwierig, die Vielzahl der Banden zuzuordnen. Dennoch kann man die Aussage machen, daß im Bereich der folgenden Nucleotide der 5 S RNA (48) bestimmt Stopstellen für den Abbau durch Milz-PDE vorhanden sind: 26-27, 42-43, 47-48, 51-52, 89-90, 110-112. Die Anga-

ben ergeben sich aus Längenbestimmungen von Fragmenten durch die R_B -Werte im 12 %igen Gel und eine Eichgerade (Kapitel 4.3).

3.7 Enzym-Substrat-Verhältnis beim Abbau durch Milz-PDE

Um darüber eine Aussage zu machen, wieviel Exonucleasemoleküle einer Enzymeinheit entsprechen, muß man das Molekulargewicht der Milz-PDE, die spezifische Aktivität der verwendeten Fraktion und den Prozentsatz aktiver Exonucleasemoleküle in dieser Proteinfraction kennen. Die Sedimentationskonstante der Milz-PDE ist 4.6 S (44). Unter der Annahme, daß dieses Enzym ein globuläres Protein ist, ergibt sich durch Vergleich mit Sedimentationskonstanten bekannter Proteine (49) ein Molekulargewicht von etwa 70.000. Weiterhin läßt sich aus eigenen Versuchen und den Angaben von Bernardi und Bernardi (44) errechnen, daß eine Einheit Milz-PDE 2-3 μ g Protein entspricht. Wenn man weiter annimmt, daß bei einer Anreicherung um den Faktor 100 ungefähr 5 % des Proteins aus Milz-PDE bestehen, so würden ungefähr 10^{12} Exonucleasemoleküle einer Enzymeinheit entsprechen.

Mit diesen Angaben läßt sich das Enzym-Substrat-Verhältnis abschätzen. Es ist z. B. im Versuch, der zur Bildlegende in Abbildung 12 beschrieben ist, ungefähr 1 : 2000.

3.8 Einfluß einer 5'-terminalen Phosphatgruppe auf den Abbau von Nucleotidketten durch Milz-PDE

Inkubiert man 1 A₂₆₀-Einheit native tRNA^{Phe}, tRNA^{Ser}, tRNA^{Tyr} oder tRNA^{Val} mit 1 Einheit Milz-PDE in 0,2 ml 100 mM Acetat-Puffer, pH 6.2, und 25 mM Ammoniumsulfat bei 37°C, so zeigt die quantitative Auswertung von Densitogrammen nach gelelektrophoretischer Trennung von Aliquots, daß unter diesen Bedingungen nach 1.5 h Inkubation tRNA^{Val} zu etwa 60 %, tRNA^{Tyr} zu 30 % und die beiden anderen tRNAs weniger als 5 % abgebaut sind. Einige Zwischenprodukte sieht man beim Ab-

bau der tRNA^{Val} (bis 7 % der tRNA-Menge) und der tRNA^{Tyr} (1 % - 2 % der tRNA-Menge). Native tRNA^{Tyr} wird in 150 mM Acetatpuffer, pH 5.0, 10 mM EDTA und 50 mM Ammoniumsulfat bei 37°C ebenfalls meßbar abgebaut. Auch Bernardi und Cantoni (45) finden unter bestimmten Bedingungen einen Abbau nativer tRNA.

Die beiden Fragmente Phe 1-36 und Ser 1-34, die an einem Einzelstrang ein 5'-terminales Phosphat tragen, werden in 75 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6.0, und 8 mM Ammoniumsulfat bei 20°C abgebaut (siehe auch Abb. 29e und h), allerdings um einen Faktor 500 - 1000 langsamer als die entsprechenden dephosphorylierten Fragmente. Dabei sind nach 70 %igem Abbau von Phe 1-36 zwei Zwischenstufen in sehr großen Ausbeuten entstanden (40 % bzw. 20 %). Es sind dies dieselben Fragmente (26 N und 13 N), die auch beim Abbau des dephosphorylierten Phe 1-36 entstehen (siehe Abb. 28b). Da diese beiden Fragmente beim Abbau von Phe 1-36 in viel größeren Konzentrationen auftreten, als irgendein Zwischenprodukt beim Abbau nativer tRNAs, muß ein 5'-terminales pGp an einem Einzelstrang schneller durch Milz-PDE abgespalten werden als ein pGp am 5'-Ende einer Doppelhelix.

3.9 Darstellung von tRNA-Fragmenten durch teilweisen Abbau mit Milz-PDE

3.9.1 Darstellung der Fragmente Phe 10/11-76, Phe 16?-76 und Phe 27-76

Unter den Reaktionsbedingungen, die in der Bildlegende zu Abbildung 12 beschrieben sind, erhält man nach 2 - 3 Minuten Inkubationszeit in guten Ausbeuten die Fragmente Phe 10/11-76, Phe 16?-76 und Phe 27-76. Um Enzym zu sparen, wird beim präparativen Ansatz mit der halben Enzymmenge 5 Minuten lang inkubiert. Je 100 A₂₆₀-Einheiten des dabei entstehenden Fragmentgemisches werden im präparativen Gel getrennt (Abb. 21). Durch die kurze Färbezeit ist das Gel noch nicht völlig durchfärbt. Dadurch entstehen die dunkleren Zonen am Rand der Gelstreifen.

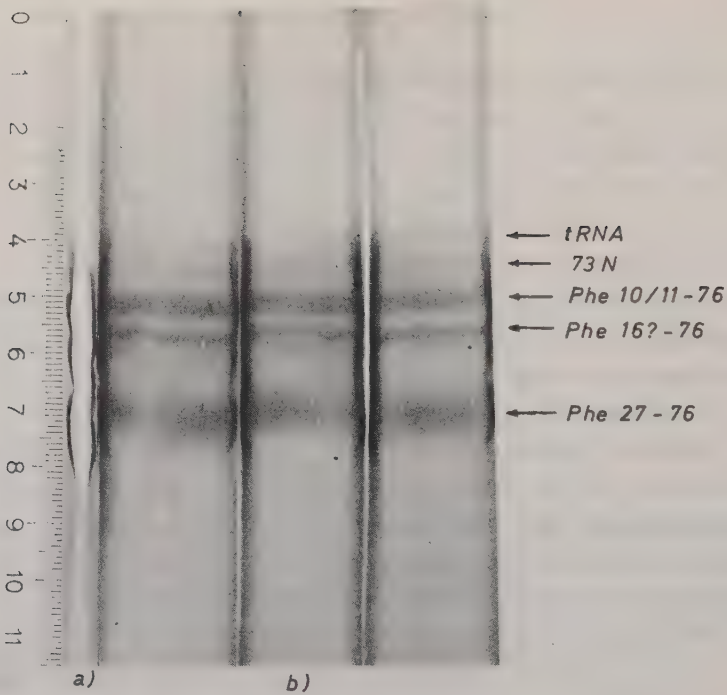


Abbildung 21: Trennung von tRNA^{Phe} -Fragmenten im präparativen Gel

270 A_{260} -Einheiten dephosphorylierte tRNA^{Phe} und 350 Einheiten Milz-PDE werden in 35 ml 75 mM Kaliumphosphat, pH 6,0, und 12 mM Ammoniumsulfat bei 37°C 5 Min. inkubiert. Die Reaktionsprodukte trennt man in 2 präparativen Gelen (11 %, 6 mm).

- a) Querschnitt eines Gelstreifens
- b) drei Gelstreifen in der Aufsicht

Der Maßstab gibt die Wanderung in cm an. Die Zuordnung der Banden ist durch Pfeile gekennzeichnet.

Die Ausbeuten für diese Darstellungsmethode sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Tabelle 3: Ausbeuten an tRNA-Fragmenten aus 100 A₂₆₀-Einheiten eines Fragmentgemisches nach Trennung im präparativen Gel

Fragment	Anteil ^{+) am Gemisch (A₂₆₀-Einheiten)}	Ausbeute (A ₂₆₀ -Einheiten)	Ausbeute (%)
Phe 10/11-76	28	15	54
Phe 16?-76	18	6	33
Phe 27-76	36	15	42

+) Errechnet durch Flächenbestimmung der Gipfel im Densitogramm der Abbildung 22 a.

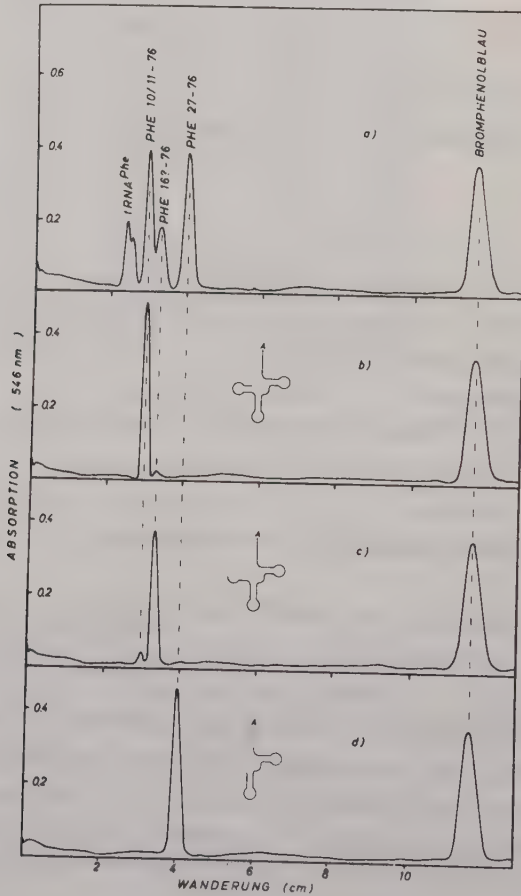
Ein gutes Kriterium für die Reinheit eines Fragments nach dem Isolieren aus dem Gel ist das Auftreten nur einer Bande im analytischen Gel (Abbildung 22). Obwohl die Fragmente im präparativen Gel besser getrennt werden (doppelte Wanderungsstrecke) als im analytischen Gel, ist manchmal eine Verunreinigung von 2 % - 5 % durch etwas kürzere bzw. längere Fragmente nicht vermeidbar (Abb. 22b, c).

3.9.2 Darstellung der Fragmente Ser 9/11-85 und 16?-85

180 A₂₆₀-Einheiten dephosphorylierte tRNA^{Ser} und 800 Einheiten Milz-PDE werden in 8,4 ml 100 mM Acetatpuffer, pH 6,2, 35 mM Ammoniumacetat und 15 mM Ammoniumsulfat 3 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Abbildung 16 c erhält man dann neben tRNA^{Ser} in guten Ausbeuten die Fragmente Ser 9/11-85 und Ser 16?-85, die in 2 präparativen Gelen (11 %, 6 mm) getrennt werden. Durch die lange Laufzeit sind die Banden weiter voneinander entfernt als in Abbildung 16a, und die Fragmente sowie die ebenfalls wieder isolierte tRNA^{Ser} sind zu 90 % - 95 % rein (siehe Abbildung 26a, c, e).

Abbildung 22: Densitogramme der isolierten tRNA^{Phe}-Fragmente nach einer Elektrophorese im 12 %igen Gel.

- a) Aliquot der in Abbildung 21 beschriebenen Spaltung
- b) 0.06 A₂₆₀-Einheiten Phe 10/11-76
- c) 0.05 A₂₆₀-Einheiten Phe 16?-76
- d) 0.06 A₂₆₀-Einheiten Phe 27-76

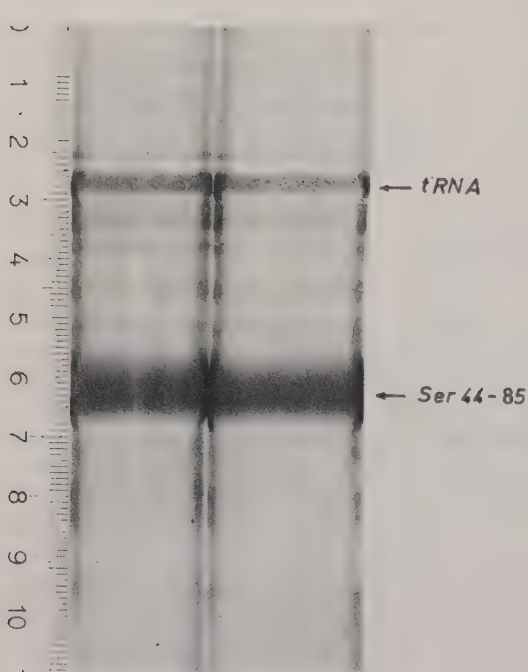


Die Ausbeuten sind gering und liegen zwischen 30 % und 50 %, und zwar 6.5 A₂₆₀-Einheiten tRNA^{Ser}, 9.5 A₂₆₀-Einheiten Ser 9/11-85 und 16 A₂₆₀-Einheiten Ser 16?-85. Um bessere Ausbeuten zu erhalten, wurde eine Trennung durch Säulenchromatographie versucht. Diese gelang aber weder mit einer Säule aus DEAE-Sephadex A 25 (0.3 x 200 cm, Gradient: 400 ml 7 M Harnstoff, pH 3.0, 0.25-0.5 M NaCl) noch mit einer Säule aus benzoylierter DEAE-Cellulose (0.5 x 25 cm, Gradient: 800 ml 50 mM Acetatpuffer, pH 5.5, 10 mM Magnesiumacetat, 0.5 - 1.5 M NaCl).

3.9.3 Darstellung des Fragments Ser 44-85

Da das Fragment Ser 44-85 nur sehr schwer von Milz-PDE weiter abgebaut werden kann (siehe Abb. 16c, d), ist für seine Darstellung die Inkubationszeit nicht sehr kritisch. Auch die Abtrennung von kleinen Mengen anderer Fragmente gelingt vollständig in einem präparativen Gel (Abbildung 23). Der verhältnismäßig große Anteil intakter tRNA^{Ser} besteht wahrscheinlich aus einem Rest nicht dephosphorylierter tRNA^{Ser}.

Abbildung 23: Präparatives Gel zur Darstellung des Fragments Ser 44-85



250 A₂₆₀-Einheiten dephosphorylierte tRNA^{Ser} und 370 Einheiten Milz-PDE werden in 35 ml 75 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0, und 12 mM Ammoniumsulfat 12 Min. bei 37°C inkubiert. Die danach isolierten 120 A₂₆₀-Einheiten Fragmentgemisch werden im präparativen Gel (11 %, 1 cm) getrennt. Die Zuordnung der Banden ist durch Pfeile gekennzeichnet. Der Maßstab gibt die Wanderung in cm an.

Aus dem Gel konnten etwa 50 A₂₆₀-Einheiten Ser 44-85 eluiert werden. Die Ausbeute ist also etwa 50 %.

3.10 Analyse der tRNA-Fragmente

3.10.1 Analyse des Fragments Phe 10/11-76

Die Analyse erfolgt durch vollständige Spaltung mit T1-RNase, Trennung (Abbildung

24) und Identifizierung (Tabelle 5) der dabei entstehenden Produkte.

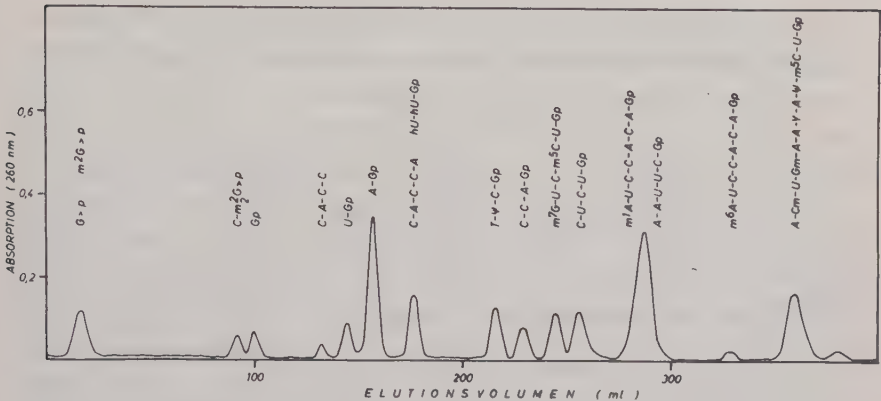


Abbildung 24: Elutionsprofil der Oligonucleotide von 11.2 A_{260} -Einheiten Phe 10/11-76 nach vollständiger Spaltung mit T1-RNase (siehe Kap. 5.9).

Beim Vergleich mit dem Elutionsprofil der $tRNA^{Phe}$ (31) sieht man, daß die Oligonucleotide C-Gp und A-U-U-U-A- $m^2G > p$ aus dem pG-Teil des Akzeptorstammes fehlen (siehe Abb. 14). Das Material im ersten Gipfel des Elutionsprofils (Abb. 24) wird mit PME und T1-RNase zum Nucleosid abgebaut. Nach Dünnschichtchromatographie (System B) sieht man 2 Flecken, die nach ihren R_f -Werten G und m^2G zuzuordnen sind. Wegen der geringen Konzentrationen kann nicht entschieden werden, ob pro Mol Fragment 1 Mol oder weniger m^2G vorliegt. Man findet allerdings zusammen 3.9 Mole Gp, G > p und $m^2G > p$ pro Mol Fragment. Ohne $m^2G > p$ würden nur 3 Mole Gp und G > p pro Mol Fragment entstehen.

Da das Nucleotid 10 der $tRNA^{Phe}$ m^2Gp ist, erhält das Fragment die Bezeichnung Phe 10/11-76.

Tabelle 5: Oligonucleotidanalyse des Fragments Phe 10/11-76

Die Extinktionskoeffizienten sind aus der Literatur übernommen (31). Von den Absorptionsspektren ist die Wellenlänge im Maximum angegeben, und zwar bei pH 7 (erste Zahl) und pH 2 (zweite Zahl). Weitere Einzelheiten sind in Kap. 5.9 beschrieben.

Spaltprodukt	A ₂₆₀ ⁻ Einh.	ξ	Mol pro Mol Fragment	R _{Up}	λ max
G > p, m ² G > p	0.63	11.4	2.65	0.46	255/258
C-m ² G > p	0.41	20	0.98	0.50	262/270
Gp	0.29	11.4	1.24	0.48	254/258
C-A-C-C	0.13	30	0.21	-0.23	260/271
U-Gp	0.42	20	1.00	1.07	255/258
A-Gp	1.67	25	3.17	0.49	258/258
C-A-C-C-A	0.70	38	0.88	-0.18	263/268
hU-hU-Gp	0.12	11.4	0.50	1.16	254/258
T-ψ-C-Gp	0.73	34	1.02	1.07	260/266
C-C-A-Gp	0.47	37	0.62	0.50	260/268
m ⁷ G-U-C-m ⁵ C-U-Gp	0.73	57	0.61	0.73	258/262
C-U-C-A-Gp	0.94	47	0.96	0.62	258/261
m ¹ A-U-C-C-A-C-A-Gp	1.13	71	0.76	0.34	259/261
A-A-U-U-C-Gp	1.57	59	1.26	0.63	257/257
m ⁶ A-U-C-C-A-C-A-Gp	0.15	71	0.11	-	-
A-Cm-U-Gm-A-A-Y-A-ψ-m ⁵ C-U-Gp	1.82	106	0.82	-	-

3.10.2 Analyse des Fragments Phe 16?-76

Nach Längenbestimmungen in 12 %- und 16 %igen Gelen entsteht das Fragment Phe 16?-76 durch eine Stopstelle in der hU-Schleife. Aus anderen Untersuchungen (50) weiß man, daß Fragmente, die mit hU beginnen, durch Milz-PDE relativ langsam abgebaut werden. Gleiches gilt für die Schlangengift-PDE (22). Bei der Bestimmung des hU-Gehaltes (51, 74) findet man 1.2 bis 1.8 Mole hU pro Mol Fragment, während in Kontrollversuchen 1.8 - 2.0 Mole hU pro Mol tRNA^{Phe} gefunden werden. Diese beiden hU befinden sich in der Sequenz der tRNA^{Phe} in Position 16 und 17 (Abb. 14). Das Fragment ist vielleicht heterogen, zu einem Teil fehlt das Nucleotid 16. (Eine Differenz von einem Nucleotid bei Fragmenten dieser Größe wird im analytischen Gel nicht erkannt.)

Auf Grund dieser Ergebnisse erhält das Fragment die Bezeichnung Phe 16?-76.

3.10.3 Analyse des Fragments Phe 27-76

Die Analyse erfolgt durch vollständige Spaltung mit T1-RNase, Trennung (Abbildung 25) und Identifizierung (Tabelle 6) der dabei entstehenden Produkte.

Im Vergleich zur intakten tRNA^{Phe} (Abbildung 14) fehlen die Oligonucleotide aus dem pG-Teil des Akzeptorstammes, aus beiden Strängen des hU-Stammes und aus der hU-Schleife. Im kleinen Gipfel vor dem Gipfel mit Gp (Abbildung 25) werden 2 Oligonucleotide gefunden, die auf Grund der R_{Up} -Werte (0.41 bzw. 0.48) und der UV-Spektren bei pH 7 (λ_{max} 259 nm bzw. 258 nm) und bei pH 2 (λ_{max} 266 nm bzw. 259 nm) nicht identifiziert werden können. Sie sind vielleicht durch unspezifische Spaltungen größerer Oligonucleotide entstanden, z. B. aus C-C-A-Gp, das oft in kleinerer als molarer Konzentration auftritt (52).

Da weder die Nucleotide 25, 26 (C-m₂G² > p) noch das Nucleotid 26 (m₂G² > p) nachgewiesen werden können, und die Nucleotide 27-30 (C-C-A-Gp) in vergleichbaren

Mengen wie in der tRNA^{Phe} gefunden werden, erhält das Fragment die Bezeichnung Phe 27-76.

Tabelle 6: Oligonucleotidanalyse des Fragments Phe 27-76

Die Werte für die Extinktionskoeffizienten sind aus der Literatur (31) übernommen. Von den Absorptionsspektren ist die Wellenlänge im Maximum angegeben, und zwar bei pH 7 (erste Zahl) und pH 2 (zweite Zahl). Weitere Einzelheiten sind in Kap. 5, 9 beschrieben.

Spaltprodukt	A ₂₆₀ - Einh.	ε	Mol pro Mol Fragment	R _{Up}	λ _{max}
Gp	0.62	11.4	1.02	0.55	252/256
C-A-C-C	0.31	30	0.19	-0.23	264/273
U-Gp	1.09	20	1.02	1.07	255/257
A-Gp	1.59	25	1.19	0.49	255/256
C-A-C-C-A	1.26	38	0.61	-0.18	262/268
T-Ψ-C-Gp	1.84	34	1.00	1.07	262/267
C-C-A-Gp	1.38	37	0.69	0.48	261/267
m ⁷ G-U-C-m ⁵ C-U-Gp	2.93	57	0.59	0.73	258/261
A-A-U-U-C-Gp	2.72	59	0.87	0.84	257/257
m ¹ A-U-C-C-A-C-A-Gp	3.64	71	0.96	0.47	259/261
m ⁶ A-U-C-C-A-C-A-Gp	0.47	71	0.08	-	260/264
A-Cm-U-Gm-A-A-Y-A-Ψ-m ⁵ C-U-Gp	5.29	106	0.93	-	258/259

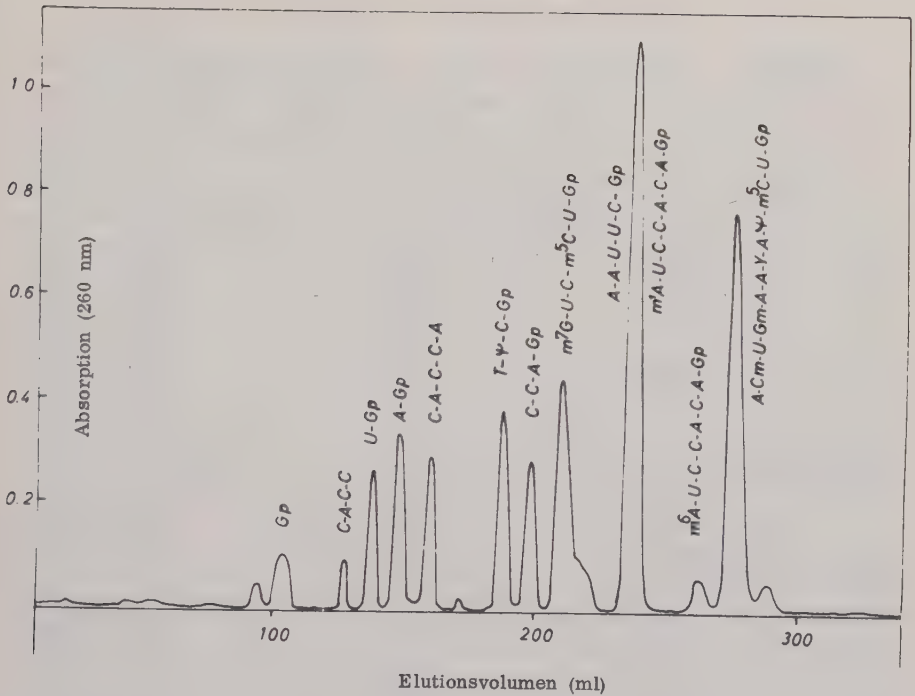
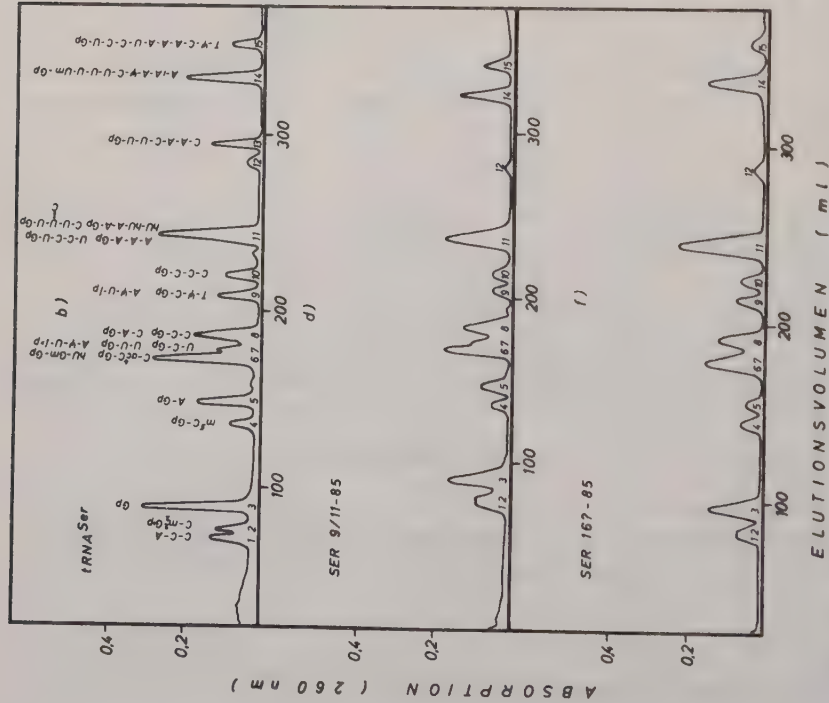
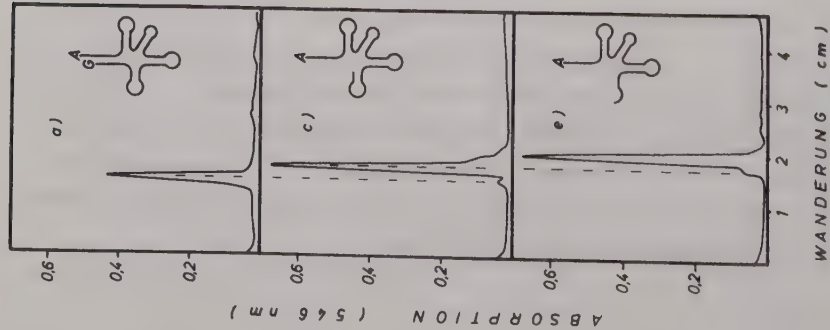


Abbildung 25: Elutionsprofil der Oligonucleotide von 22 A₂₆₀-Einheiten Phe 27-76 nach vollständiger Spaltung mit T1-RNase (siehe Kapitel 5.9).

3.10.4 Analyse der Fragmente Ser 9/11-85 und Ser 16?-85

Die aus dem präparativen Gel (Kap. 3.9.2) isolierte tRNA^{Ser} wird parallel zu den Fragmenten Ser 9/11-85 und Ser 16?-85 vollständig mit T1-RNase gespalten. Die Elutionsprofile der dabei entstehenden Produkte sind in Abbildung 26b, d, f zu sehen. Da die Isolierung der Oligonucleotide mißlang, muß man versuchen, auf Grund der Absorptionsspektren im Säuleneluat und durch Vergleich (Tabelle 7) der Elutionsprofile der Fragmente Ser 9/11-85 und Ser 16?-85 mit dem bekannten Elutionsprofil der tRNA^{Ser} (53) eine ungefähre Analyse zu erhalten.



e) Densitogramm von 0,04 A₂₆₀-Einheiten, f) Elutionsprofil von 7,8 A₂₆₀-Einheiten Ser 167-85.

Abb. 26: Analyse der isolierten tRNA Ser und der Fragmente Ser 9/11-85 und Ser 167-85.

Gezeigt ist jeweils ein Densitogramm der elektrophoretischen Trennung im 12 %igen Gel und das Elutionsprofil der Oligonucleotide nach Totalspaltung mit T₁-RNase⁵⁷.

- Densitogramm von 0,02 A₂₆₀-Einheiten,
- Elutionsprofil von 7,9 A₂₆₀-Einheiten der isolierten tRNA.
- Densitogramm von 0,04 A₂₆₀-Einheiten,
- Elutionsprofil von 7,1 A₂₆₀-Einheiten Ser 9/11-85.

Tabelle 7: Analytische Daten für die Gipfel der Elutionsprofile aus Abbildung 26.
Die Extinktionskoeffizienten sind aus (9) übernommen und werden für Oligonucleotide,
die zusammen eluiert wurden, gemittelt.

		A_{260} -Einheiten			ξ Mol/Mol C-C-C-Gp			
Nr.	Spaltprodukt	tRNA	9/11-85	16?-85	tRNA	9/11-85	16?-85	
1	C-C-A							
2	C-m ² G > p	0.56	0.69	0.54	²⁷ ₂₀	2.20	2.60	1.80
3	Gp	0.86	0.84	0.79	11	6.80	6.60	5.20
4	m ⁵ C-Gp	0.19	0.20	0.35	16	1.13	1.14	1.66
5	A-Gp	0.41	0.38	0.26	25	1.49	1.38	0.79
6	C-ac ⁴ C-Gp				²⁴			
6	hU-Gm-Gp				²³			
6	U-U-Gp	1.29	1.23	1.07	²⁹	4.50	4.30	3.10
7	U-C-Gp				²⁷			
8	C-C-Gp				²⁴			
8	C-A-Gp	0.74	0.79	0.84	³⁰	2.40	2.50	2.30
9	A- Ψ -U- I_p^{+})				³⁷			
9	T- Ψ -C-Gp	0.32	0.26	0.46	³²	0.85	0.69	1.02
10	C-C-C-Gp	0.33	0.33	0.39	30	1.00	1.00	1.00
11	A-A-A-Gp				⁴⁴			
11	U-C-C-U-Gp				⁴²			
11	hU-hU-A-A-Gp	1.38	1.28	1.83	35	3.10	2.85	3.42
11	C-U-U-U-Gp				⁴³			
11	C-U-C-U-Gp				⁴²			
12	?	0.27	0.15	0.23	-	-	-	-
13	C-A-A-C-U-U-Gp	0.55	0.0	0.0	66	0.76	0.0	0.0
14	A-iA-A- Ψ -C-U-U-U-Um-Gp	0.96	0.82	1.26	84	1.04	0.89	1.14
15	T- Ψ -C-A-A-A-U-C-C-U-Gp	0.41	0.45	0.35	80	0.38	0.52	0.34

⁺) Ein Teil des A- Ψ -U- I_p erscheint als A- Ψ -U-I > p im Gipfel 6.

Nach Längenbestimmungen in 12 %- und 16 %igen Gelen entsteht das Fragment Ser 9/11-85 durch eine Stopstelle zu Beginn des hU-Stammes, denn es läuft genauso schnell wie dephosphorylierte tRNA^{Phe} , die aus 76 Nucleotiden besteht (siehe Abb. 15). Damit stimmen das Elutionsprofil (Abb. 26d) und die Menge der Oligonucleotide in den einzelnen Gipfeln (Tabelle 7) überein. Das Heptanucleotid C-A-A-C-U-U-Gp (Gipfel 13) aus dem pG-Teil des Akzeptorstammes der tRNA^{Ser} fehlt, und von dieser Sequenz ist höchstens noch das Gp (Nucleotid 9) vorhanden. Es würden dann 7 Mole Gp pro Mol Fragment entstehen. Nach Tabelle 11 findet man 6.6 Mole. Da diese Methode zur quantitativen Bestimmung für das Mononucleotid Gp oft zu hohe Werte ergibt, kann das Gp in Position 9 fehlen und vielleicht auch das Gp in Position 10. Das Fragment erhält daher die Bezeichnung Ser 9/11-85.

Das Fragment Ser 16?-85 entsteht nach Längenbestimmungen in 12 %- und 16 %igem Gel durch eine Stopstelle in der hU-Schleife. Damit stimmt überein, daß 2.1 bis 2.3 Mole hU pro Mol Fragment (51, 74) gefunden werden (in Kontrollversuchen 2.2 - 2.7 Mole hU pro Mol tRNA^{Ser}), und daß nach Tabelle 7 das Dinucleotid A-Gp aus der hU-Schleife (Position 14/15, siehe Abb. 15) fehlt. Die Menge A-Gp, die im Gipfel 5 der Abb. 26f noch gefunden wird, entsteht auf Grund der verschiedenen Sequenzen von $\text{tRNA}_I^{\text{Ser}}$ und $\text{tRNA}_{II}^{\text{Ser}}$ (Abb. 15) aus der TΨC-Schleife des Fragments. Nach dem hU-Gehalt zu urteilen, ist die Fraktion heterogen. Wenn zum Teil das hU der Position 16 fehlt, müßte in entsprechender Menge das Dinucleotid Gm-Gp entstehen. Dies würde die Zunahme der Dinucleotidmenge im Gipfel 4 erklären (Tabelle 7), und das veränderte Spektrum, das deutlich anders ist als das von reinem $\text{m}^5\text{C-Gp}$. Nach dem Spektrum hätte das neu entstandene Dinucleotid bei pH 7 ein Absorptionsmaximum zwischen 250 und 255 nm, und bei pH 2-3 zwischen 257 und 259 nm. Diese Daten sprechen für Gm-Gp.

Vergleicht man die Mengen der anderen Oligonucleotide mit den Ergebnissen der tRNA^{Ser} -Spaltung (Tabelle 7), so sind die Abweichungen für Gp, den Dinucleotid- und den Trinucleotidbereich erklärlich, wenn das Fragment mit dem Nucleotid 15, 16 oder 17 anfängt. Das Fragment erhält daher die Bezeichnung 16?-85.

3.10.5 Analyse des Fragments Ser 44-85

Die Analyse erfolgt durch vollständige Spaltung mit T1-RNase, Trennung (Abbildung 27) und Identifizierung (Tabelle 8) der dabei entstehenden Produkte.

Da pro Mol Fragment ein Mol Um-Gp gefunden wird und in der Sequenz der tRNA^{Ser} (Abb. 15) das Nucleotid 44 Ump ist, muß das Fragment mit diesem Nucleotid beginnen. Alle anderen Oligonucleotide der Abbildung 27 ergeben die Sequenz zwischen den Nucleotiden 46-85 der tRNA^{Ser}_{I, II*}

Das Fragment erhält somit die Bezeichnung Ser 44-85.

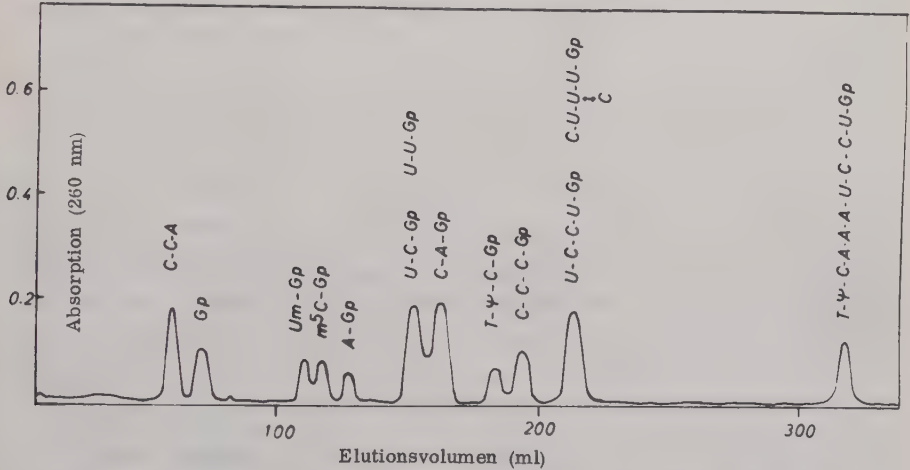


Abbildung 27: Elutionsprofil der Oligonucleotide von 8,7 A₂₆₀-Einheiten Ser 44-85 nach vollständiger Spaltung mit T1-RNase (siehe Kap. 5.9).

Tabelle 8: Oligonucleotidanalyse des Fragments Ser 44-85

Die Extinktionskoeffizienten sind aus der Literatur übernommen (9). Von den Absorptionsspektren ist die Wellenlänge im Maximum angegeben, und zwar bei pH 7 (erste Zahl) und bei pH 2 (zweite Zahl). Wenn nicht anders angegeben wurden die nach PME/PDE-Spaltung erhaltenen Nucleoside im System A getrennt. Weitere Einzelheiten sind im Kap. 5.9 beschrieben.

Spaltprodukt	A ₂₆₀ - Einh.	ϵ	Mol pro Mol CCCGp	R _{Up}	$\lambda_{\max}$	PME/PDE
C-C-A	0.70	27	0.99	-0.05	263/270	-
Gp	0.57	11	1.98	0.55	253/257	G
Um-Gp	0.49	20	0.94	1.00	256/258	Um, G ⁺⁺⁾
m ⁵ C-Gp	0.40	16	0.95	0.58	255/282	m ⁵ C, G ⁺⁺⁺⁾
A-Gp	0.33	25	0.51	0.59	256/257	A, G
U-C-Gp	0.67	27	0.94	0.86	258/262	U, C, G
U-U-Gp	0.73	29	0.96	1.21	257/258	U, G
C-A-Gp	1.42	30	1.82	0.22	256/258	C, A, G ^{+))}
T- Ψ -C-Gp	0.47	32	0.56	0.94	259/264	-
C-C-C-Gp	0.79	30	1.00	0.42	267/278	C, G ^{+))}
U-C-C-U-Gp		42		0.93	258/265	U, C, G
C-U-U-U-Gp	1.60	43	1.48	1.15	258/260	U, G
C-U-C-U-Gp		42		0.93	258/265	U, C, G
T- Ψ -C-A-A-A-U-C-C-U-Gp	0.82	80	0.39	-	-	-

+) Nach System B und C

++) Nach System A und B

+++ Nach System A und C

3.11 Abbau von tRNA-Fragmenten und Fragmentkombinationen durch Milz-PDE

Die Rekombination von 2 Hälften einer tRNA führt in einem hohen Prozentsatz wieder zu einer biologisch aktiven Tertiärstruktur (29, 35, 54, 55). Kann nun allein durch eine Analyse von Abbaukinetiken mit Milz-PDE der Nachweis erbracht werden, daß es zwischen verschiedenen tRNA-Fragmenten zu einer Komplexbildung kommt?

Der schrittweise Abbau von tRNA-Fragmenten und Fragmentkombinationen durch Milz-PDE wird genau wie der Abbau von tRNA (Kap. 3.1 - 3.3) an einigen Stellen so stark verlangsamt, daß die entsprechenden Abbauprodukte in großen Konzentrationen auftreten und im analytischen Gel Banden geben (Abbildung 28, Abbildung 29). Dadurch kann man den Abbau der Fragmente gut verfolgen.

3.11.1 Abbau der dephosphorylierten Fragmente Phe 1-36 und Phe 38-76

Beim Abbau von Phe 38-76 (Abb. 28a) gibt es 4 Stopstellen, und beim Abbau von Phe 1-36 (Abb. 28b) gibt es 2 Stopstellen für die Milz-PDE. Die Reaktionsgeschwindigkeit wird durch Mg^{++} -Ionen ($Mg : P = 1 : 1$) um 10 % - 20 % verlangsamt. Bei 20°C erfolgt der Abbau von Phe 1-36 zum Fragment 26 N mit gleicher Geschwindigkeit, der weitere Abbau zum Fragment 13 N ist aber um einen Faktor 8-10 verlangsamt.

Die Abbaukinetiken von Gemischen dieser Fragmente (Abb. 28c - f) sind nicht so leicht zu interpretieren. Zum einen sind die Ausgangsprodukte Phe 1-36 und Phe 38-76 in diesen Gelen nicht getrennt. Daher ist nur die Summe der Geschwindigkeiten, mit der diese Fragmente abgebaut werden, durch die Abnahme der Fläche unter den entsprechenden Gipfeln bestimmbar. Zum anderen ist die Zuordnung der entstehenden Produkte schwierig. Beim Abbau von Phe 1-36 und Phe 38-76 entstehen zum Teil Fragmente gleicher oder ähnlicher Kettenlänge, die im Gel gleich weit wandern (Abb. 28a, b). Zwei Fragmente mit einer Länge von etwa 30 bzw. 19 Nucleotiden entstehen aber nur beim Abbau von Phe 38-76 (Abb. 28a), so daß das Auf-

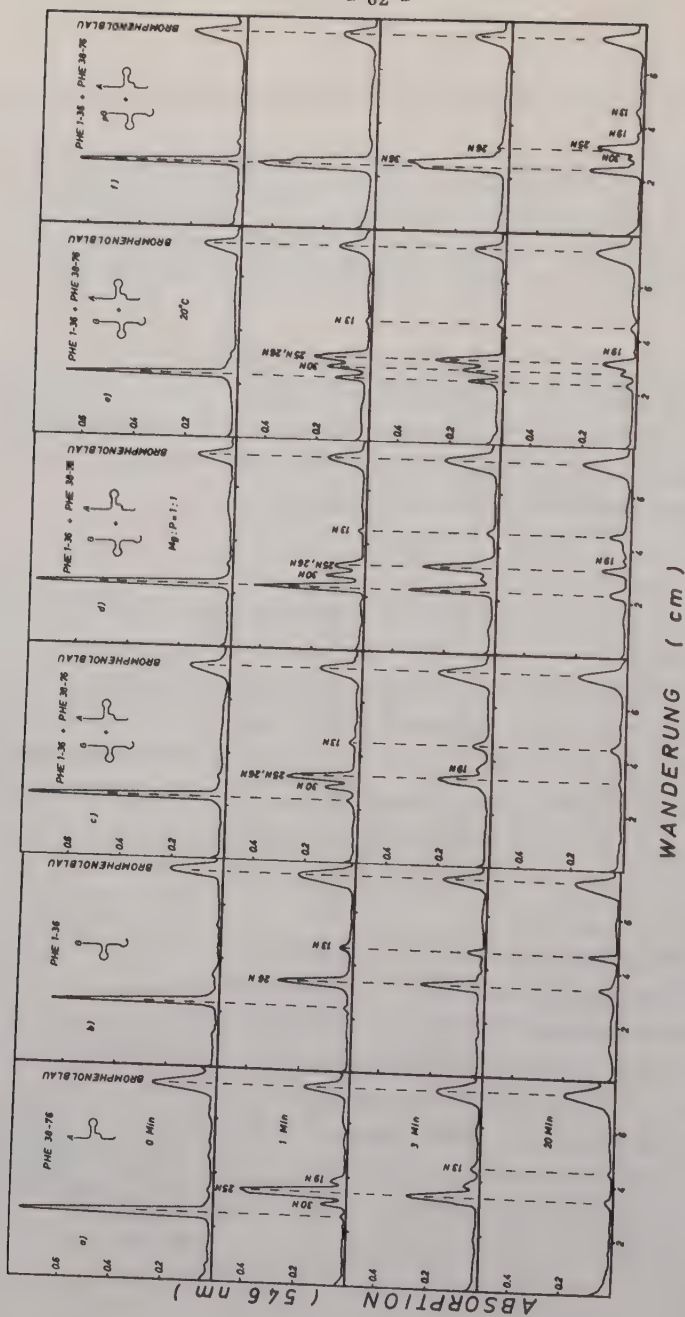


Abbildung 28

Abbildung 28: Einfluß der Temperatur und Mg^{++} -Konzentration auf den Abbau der Fragmente Phe 1-36 und Phe 38-76 und eines äquimolaren Gemisches dieser Fragmente durch Milz-PDE

0,74 A_{260} -Einheiten dephosphorylierter tRNA^{Phe}-Fragmente oder Fragmentkombinationen und 20 Einheiten Milz-PDE werden in 0,2 ml 75 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0, und 15 mM Ammoniumsulfat inkubiert. Die Reaktionstemperatur beträgt, sofern nicht anders angegeben, 37°C.

Zu verschiedenen Zeiten werden Aliquots von 0,037 A_{260} -Einheiten entnommen und im 16 %igen Gel (4°C, 0,3 cm Tasche) getrennt. Die Densitogramme zeigen für jede Kinetik die Zusammensetzung der Reaktionsprodukte nach 0, 1, 3 und 20 Min. Inkubation. Die Länge dieser Reaktionsprodukte wird aus dem R_B -Wert bestimmt und steht über den entsprechenden Gipfeln in den Densitogrammen.

treten der entsprechenden Gipfel im Densitogramm beim Abbau von Fragmentgemischen Hinweise zum Verhalten dieser tRNA-Hälfte gibt.

Ein äquimolares Gemisch der dephosphorylierten Fragmente Phe 1-36 und Phe 38-76 wird unter 3 verschiedenen Bedingungen (Abb. 28c, d, e) durch Milz-PDE abgebaut. Die Kinetiken, die durch eine Auswahl von Densitogrammen dargestellt sind, bestätigen andere Ergebnisse (56, 57) über die Rekombination dieser tRNA^{Phe}-Fragmente.

- 1) Bei 37°C und Abwesenheit von Mg^{++} -Ionen werden die Fragmente unabhängig voneinander abgebaut (Abb. 28c). Dies ist auch nicht anders zu erwarten, da es unter diesen Bedingungen nur zu einem geringen Prozentsatz zu einer Rekombination kommt (Abb. 1 in 57).
- 2) Bei 37°C und Anwesenheit von Mg^{++} -Ionen ist der Abbau stark verlangsamt (Abb. 28d). Unter diesen Bedingungen kommt es zu einem hohen Prozentsatz zur Rekombination (Abb. 2a in 56). Die 5'-Enden der Fragmente Phe 1-36 und Phe 38-76 befinden sich dann in der Doppelhelix des Akzeptorstammes bzw. Anticodonstammes. Einen durch Mg^{++} -Ionen stabilisierten Doppelstrangbereich kann die

Milz-PDE nur sehr schwer abbauen (siehe Kap. 3.3, Abb. 18). Daher sollte man erwarten, daß der Abbau beider tRNA^{Phe}-Fragmente in gleichem Ausmaß verlangsamt ist. Da die Abnahme der Akzeptoraktivität für Phenylalanin im Verlauf der Reaktion genau der Flächenabnahme des Gipfels folgt, der durch die Hälften der tRNA^{Phe} gebildet wird, muß stets ein äquimolares Gemisch beider Fragmente vorliegen. Die Konzentration an Phe 1-36 bzw. Phe 38-76 nimmt also gleichmäßig ab.

- 3) Bei 20°C und Abwesenheit von Mg⁺⁺-Ionen werden 70-80 % der tRNA^{Phe}-Hälften sehr schnell und unabhängig voneinander zu kürzeren Fragmenten abgebaut, während der Rest von 20 % - 30 % gegen Milz-PDE resistenter ist (Abb. 28e). Mg⁺⁺-Ionen sind nicht unbedingt für eine Rekombination von tRNA^{Phe}-Hälften notwendig (57). Wenn man annimmt, daß unter den Abbaubedingungen 20 % - 30 % zu einer tRNA-Struktur rekombiniert sind, so ist die Abbaukinetik zu verstehen. Denn bei 20°C erfolgt mit ähnlichen Salzkonzentrationen kein meßbarer Abbau der dephosphorylierten tRNA^{Phe} und nur ein sehr langsamer Abbau der tRNA^{Ser} (Tabelle 2a). Doppelsträngige Bereiche werden demnach auch bei Abwesenheit von Mg⁺⁺-Ionen bei dieser Temperatur durch Milz-PDE kaum angegriffen.

In Abbildung 28f ist eine Kinetik durch eine Auswahl von Densitogrammen dargestellt, bei der ein äquimolares Gemisch aus am 5'-Ende phosphoryliertem Phe 1-36 und dephosphoryliertem Phe 38-76 mit Milz-PDE reagiert. Da diese Exonuclease dephosphorylierte Nucleotidketten wesentlich schneller angreift (siehe Kap. 3.8), müssen alle Abbauprodukte überwiegend aus Phe 38-76 entstehen. Die Abbaubedingungen sind identisch mit denen in Abbildung 28c. Man sollte nur zu einem geringen Prozentsatz eine Assoziation zwischen den beiden Fragmenten erwarten (Abb. 1 in 57) und demnach einen schnellen Abbau von Phe 38-76. Dennoch ist der Abbau stark verlangsamt, und das Entstehen des Fragments 36 N weist auf eine neue Stopstelle hin. Wie aber Versuche mit kleiner Enzymkonzentration zeigen (50), entsteht beim Abbau von Phe 38-76 allein immer erst das Fragment 36 N. Das phosphorylierte Fragment muß demnach das Enzym hemmen, und infolge der stark verlangsamteten Reaktionsgeschwindigkeit kann das Fragment 36 N, anders als in Abbildung 28a und

c, während der kurzen Inkubationszeiten beobachtet werden.

Diese Hemmung der Milz-PDE durch Fragmente mit einer 5'-Phosphatgruppe wird durch Versuche bestätigt, bei denen der Abbau von dephosphoryliertem Phe 1-36 zum Fragment 26 N unter Bedingungen verfolgt wird, die in der Bildlegende zu Abbildung 28 beschrieben sind. Danach hemmen $0.5 A_{260}$ -Einheiten der phosphorylierten Fragmente Phe 1-36 bzw. Ser 1-34 die Reaktion um einen Faktor 60 - 100 bzw. 10 - 20.

Abschließend ist festzustellen, daß durch Rekombination von Hälften der tRNA^{Phe} infolge der Ausbildung von Doppelsträngen an den 5'-Enden der Primärangriff durch Milz-PDE stark verlangsamt ist, und dies als Induktion einer neuen Stopstelle betrachtet werden kann. Der weitere Abbau ist nur durch die Stopstellen charakterisiert, die auch bei den getrennten Hälften beobachtet werden.

3.11.2 Abbau des dephosphorylierten Fragments Ser 36-85

Beim Abbau von Ser 36-85 durch Milz-PDE entstehen 2 Fragmente (Abb. 29a), die auf Grund von Längenbestimmungen durch ihren R_B -Wert wahrscheinlich mit den beiden kürzesten Fragmenten identisch sind, die beim Abbau von tRNA^{Ser} beobachtet werden (siehe Abb. 15). In den Abbaukinetiken (Abb. 29b, c) zeigen die Meßpunkte nach 160 Minuten Inkubation, daß die Doppelhelix aus 4 G-C-Paaren zu Beginn des Fragments 41 N bei Anwesenheit von Mg^{++} -Ionen langsamer zu Mononucleotiden abgebaut wird, als bei Abwesenheit von Mg^{++} -Ionen.

Bei Gegenwart der phosphorylierten Fragmente Ser 1-34 (Abb. 29d) und Phe 1-36 (Abb. 29g) entstehen aus Ser 36-85 wiederum die Fragmente 48 N und 41 N, allerdings mit geringerer Geschwindigkeit. Bei der Interpretation dieser Kinetiken muß man 2 Effekte unterscheiden:

- 1) Die Hemmung der Nuclease durch die phosphorylierten Fragmente (Kap. 3.11.1)

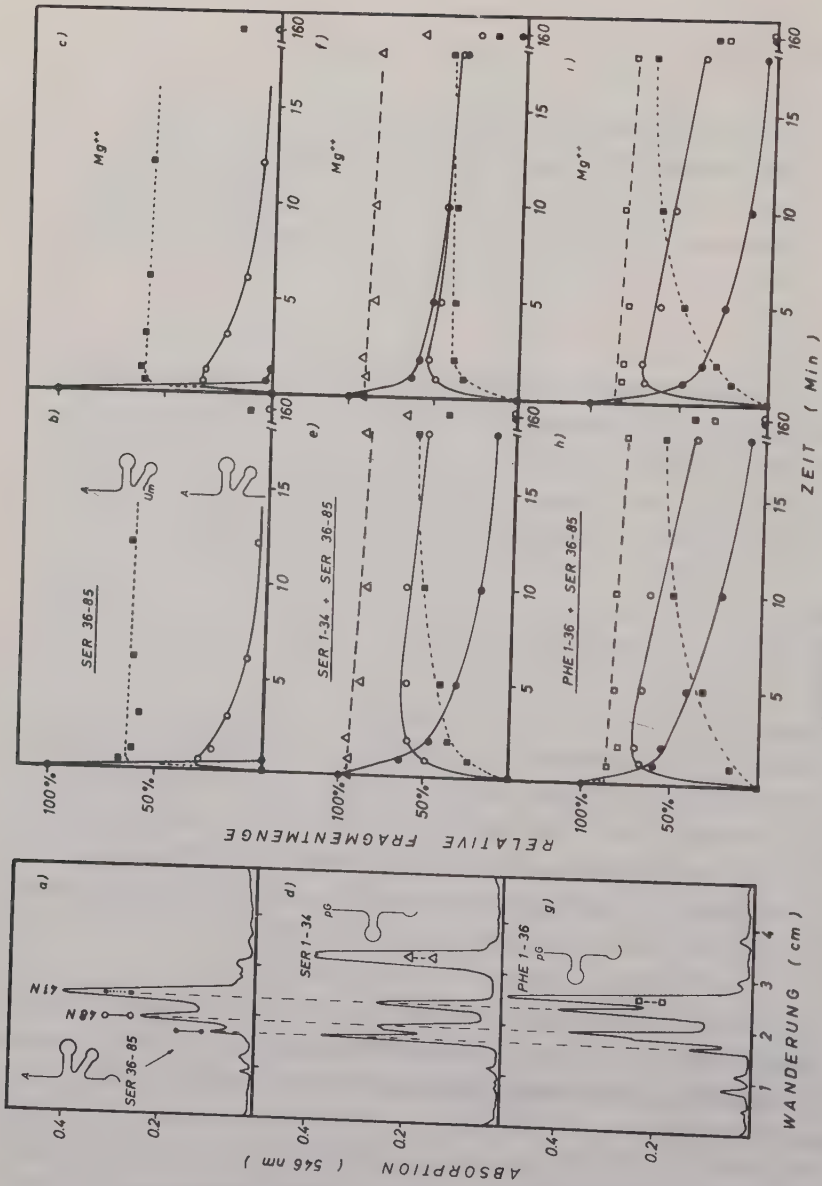


Abbildung 29

Abbildung 29: Einfluß der am 5'-Ende phosphorylierten Fragmente Ser 1-34 und Phe 1-36 auf den Abbau des dephosphorylierten Fragments Ser 36-85 durch Milz-PDE

0.44 A₂₆₀-Einheiten Ser 36-85 werden bei Abwesenheit und Anwesenheit von 0.40 A₂₆₀-Einheiten der phosphorylierten Fragmente Ser 1-34 oder Phe 1-36 mit 20 Einheiten Milz-PDE in 0.2 ml 75 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6.0, und 15 mM Ammoniumsulfat bei 20°C mit und ohne Mg⁺⁺-Ionen inkubiert. (Bei Anwesenheit von Mg⁺⁺-Ionen ist das Verhältnis von Phosphodiestergruppen zu Mg⁺⁺ 1 zu 1.) Zu verschiedenen Zeiten werden Aliquots entnommen und im 16 %igen Gel (4°C, 0.3 cm Tasche) getrennt. Die Auswertung der Kinetiken erfolgt nach dem Prinzip, das in Kapitel 5.1.2 beschrieben ist.

Abbau von Ser 36-85:

- a) Densitogramm der elektrophoretischen Trennung eines Aliquots mit 0.022 A₂₆₀-Einheiten nach 0.6 Min. Inkubation bei Anwesenheit von 0.3 mM Magnesiumsulfat.
b), c) Kinetik des Abbaus bei Abwesenheit bzw. Anwesenheit von Mg⁺⁺-Ionen. Die Symbole entsprechen denen in Teil a) dieser Abbildung.

Abbau von Ser 36-85 in Gegenwart von Ser 1-34

- d) Densitogramm der elektrophoretischen Trennung eines Aliquots mit 0.042 A₂₆₀-Einheiten nach 10 Min. Inkubation bei Anwesenheit von 0.6 mM Magnesiumsulfat.
e), f) Kinetik des Abbaus bei Abwesenheit bzw. Anwesenheit von Mg⁺⁺-Ionen. Die Symbole entsprechen denen in Teil a) und d) dieser Abbildung.

Abbau von Ser 36-85 in Gegenwart von Phe 1-36

- g) Densitogramm der elektrophoretischen Trennung eines Aliquots mit 0.042 A₂₆₀-Einheiten nach 10 Min. Inkubation bei Gegenwart von 0.6 mM Magnesiumsulfat.
h), i) Kinetik des Abbaus bei Abwesenheit bzw. Anwesenheit von Mg⁺⁺-Ionen. Die Symbole entsprechen denen in Teil a) und g) dieser Abbildung.

- 2) Die Hemmung des Abbaus infolge der Ausbildung neuer Doppelstränge durch Rekombination (Kap. 3.11.1).

Der erste Effekt wird nicht durch Mg^{++} -Ionen beeinflusst. Phe 1-36 hemmt demnach den Abbau von Ser 36-85 nur durch seine Wechselwirkung mit der Nuclease, denn die Abbaukinetiken bei Abwesenheit (Abb. 29 h) und Anwesenheit (Abb. 29 i) von Mg^{++} -Ionen unterscheiden sich nur unwesentlich voneinander.

Der zweite Effekt wird aber durch Mg^{++} -Ionen beeinflusst, da bei der Reaktionstemperatur von $20^{\circ}C$ die Rekombination von Hälften einer tRNA bei Anwesenheit von Mg^{++} -Ionen stark erhöht ist (56, 57). Ser 1-34 hemmt bei Abwesenheit (Abb. 29e) von Mg^{++} -Ionen hauptsächlich durch seine Wechselwirkung mit der Nuclease. Die Abbaukinetik hat große Ähnlichkeit mit der in Abbildung 29h. Bei Anwesenheit (Abb. 29f) von Mg^{++} -Ionen hemmt Ser 1-34 aber zusätzlich durch Rekombination mit Ser 36-85. Aus der Kleeblattstruktur der tRNA^{Ser} (Abb. 15) kann man entnehmen, daß die ersten 3 Nucleotide A-iA-A des Fragments Ser 36-85 in einem Komplex mit Ser 1-34 noch in einem Einzelstrangbereich liegen. Sie sollten also relativ schnell abgebaut werden. Das stimmt nur zum Teil, denn etwa 30 % des Fragments Ser 36-85 sind resistent gegen einen Primärangriff der PDE (Abb. 29f). Das beruht vielleicht auf einer besonderen Struktur des 5'-Endes in der Anticodonschleife.

Weiterhin kann man aus der Kleeblattstruktur der tRNA^{Ser} entnehmen, daß das 5'-Ende des Fragments 48 N in einem Komplex mit Ser 1-34 in der Doppelhelix des Anticodonstammes liegt. Durch Mg^{++} -Ionen wird ein Doppelstrang so stabilisiert, daß ein Abbau durch Milz-PDE extrem verlangsamt ist (siehe Kap. 3.3, Abb. 18 und Kap. 3.11.1, Abb. 28d). Tatsächlich beobachtet man auch noch nach langen Inkubationszeiten eine hohe Konzentration an Fragment 48 N (Abb. 29 f) im Gegensatz zum Abbau bei Abwesenheit (Abb. 29 e) von Mg^{++} -Ionen.

Abschließend läßt sich sagen, daß beim Abbau von Ser 36-85 in Gegenwart der phosphorylierten Fragmente Ser 1-34 bzw. Phe 1-36 keine neuen Stopstellen induziert werden, sondern abhängig vom Ausmaß einer Komplexbildung oder einer Hemmung

vorhandene Stopstellen verstärkt werden.

3.12 Akzeptoraktivität für Aminosäuren von Fragmenten und Fragmentkombinationen

Da die Milz-PDE die Eigenschaft hat, vornehmlich vor Doppelsträngen mit G-C-Paaren den Abbau von tRNAs zu unterbrechen (Abb. 14, 15, 17), kann man auf diesem Wege Fragmente erhalten, die mit einem Doppelstrang beginnen. Diese Fragmente besitzen ein intaktes CCA-Ende und können allein und nach Kombination mit einem Fragment, das die durch Milz-PDE abgebauten Nucleotide zum Teil oder vollständig enthält, auf ihre Akzeptoraktivität für Aminosäuren getestet werden. Interessant sind vor allem Fragmente und Fragmentkombinationen, denen im Vergleich zur intakten tRNA nur wenige Nucleotide fehlen.

3.12.1 Akzeptoraktivität von Kombinationen verschiedener tRNA^{Phe}-Fragmente

In Abbildung 30 sind die Ergebnisse für eine Reihe von Fragmentkombinationen dargestellt. Da den CCA-Fragmenten aus tRNA^{Phe} zum Teil das endständige A fehlt, enthalten die Inkubationsansätze Nucleotidyltransferase, die auch in Fragmentkombinationen das CCA-Ende regeneriert (58).

Verschiedene Versuche mit der Kombination Phe 1-18 + Phe 27-76 (Abb. 30 c) ergeben immer einen geringen Prozentsatz (2 % - 4 %) Beladung mit Phenylalanin. Aber obwohl die Fragmente im analytischen Gel jeweils nur eine Bande zeigen, und eine Verunreinigung durch 0.5 % noch gut zu erkennen wäre, ist die Akzeptoraktivität zu gering, als daß man den hU-Stamm als Erkennungsregion für die Aminoacyl-tRNA-Synthetase ausschließen könnte.

Die anderen Versuche sagen nur, daß Teile der tRNA^{Phe}, die in einem Komplex zweier Fragmente doppelt vorhanden sind, die Erkennung durch die Aminoacyl-

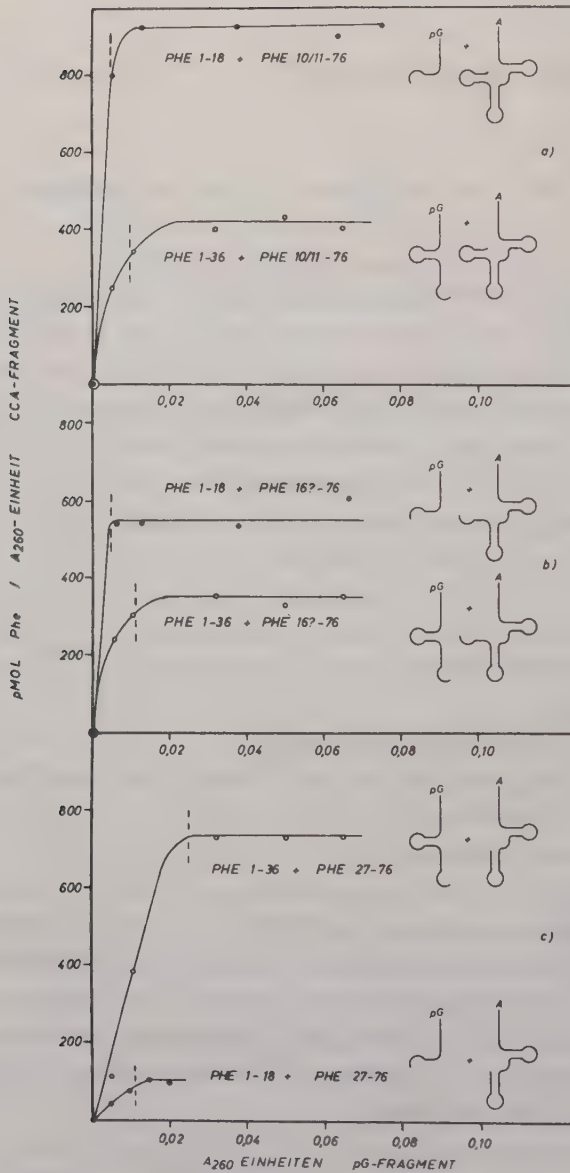


Abbildung 30: Vergleich der Akzeptoraktivität für Phenylalanin von Kombinationen verschiedener tRNA-Fragmente.

Abbildung 30 (Fortsetzung)

Das CCA-Fragment wird mit steigenden Mengen pG-Fragment 60 Min. bei 20°C inkubiert. Weitere Einzelheiten sind in Kapitel 5.8 beschrieben.

- a) 0,018 A₂₆₀-Einheiten Phe 10/11-76 + Phe 1-18 bzw. Phe 1-36
- b) 0,018 A₂₆₀-Einheiten Phe 16?-76 + Phe 1-18 bzw. Phe 1-36
- c) 0,033 A₂₆₀-Einheiten Phe 27-76 + Phe 1-18 bzw. Phe 1-36

An den Stellen, die durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet sind, liegt ein äquimolares Gemisch beider Fragmente vor.

tRNA-Synthetase und die Beladung des CCA-Endes mit Phenylalanin nicht stören. Folgende Regionen dürfen doppelt vorkommen: Teile des hU-Stammes und der hU-Schleife (Phe 1-18 + Phe 10/11-76), Teile des Anticodonstammes und der Anticodonschleife (Phe 1-36 + Phe 27-76, Phe 1-36 + Phe 16?-76), sowie der ganze hU-Stamm mit der hU-Schleife und zusätzlich Teile des Anticodonstammes und der Anticodonschleife (Phe 1-36 + Phe 10/11-76).

3.12.2 Akzeptoraktivität von Kombinationen verschiedener tRNA^{Ser}-Fragmente und des Fragments Ser 9/11-85

Die Beladungsreaktionen für einige der getesteten Fragmentkombinationen sind in Abbildung 31 dargestellt. Man sieht wieder, daß eine Verdoppelung von bestimmten Regionen die Beladung des CCA-Endes mit Serin nicht verhindert. Diese Regionen sind wie in tRNA^{Phe}-Fragmentkombinationen (Kap. 3.12.1) der hU-Stamm mit der hU-Schleife zusammen mit Teilen des Anticodonstammes und der Anticodonschleife (Ser 1-34 + Ser 9/11-85). Eine andere Fragmentkombination, die den TΨC-Stamm zusammen mit der TΨC-Schleife, den Extraarm und Teile des Anticodonstammes doppelt enthält, besitzt ebenfalls Akzeptoraktivität für Serin (46).

Auch wenn Teile des Anticodonstammes fehlen erfolgt noch eine Beladung (Abb. 31 e, f). (Die Fraktion des Fragments Ser 44-85, die für die Zeitabhängigkeit der Beladungsreaktion benutzt wurde, bestand nach einer Kontrolle im analytischen Gel nur noch zu 60 % aus Ser 44-85 und zu 40 % aus kleineren Fragmenten. Das erklärt die unterschiedlichen Plateauwerte in Abbildung 31 e und f).

Interessant ist das Verhalten des Fragments Ser 9/11-85. Es wird im Unterschied zu den anderen CCA-Fragmenten aus tRNA^{Ser} und tRNA^{Phe} bei Abwesenheit des pG-Fragments mit Aminosäure beladen (Abb. 31 a, Abb. 32, Tabelle 10). Allerdings enthält das aus dem präparativen Gel isolierte Fragment Ser 9/11-85 nach Abbildung 26 c noch 5 % dephosphorylierte tRNA^{Ser} und 10 % Ser 16?-85. (Im Elutionsprofil der Oligonucleotide nach Totalspaltung mit T1-RNase (Abb. 26 d) macht sich diese geringe Verunreinigung mit tRNA^{Ser} nicht bemerkbar. Man findet kein C-A-A-C-U-U-Gp, das aus tRNA^{Ser} entstehen müßte.) Auf Grund der vorhandenen Menge an tRNA^{Ser} sollte man eine Akzeptoraktivität unter 100 pMol Ser/A₂₆₀-Einheit der Fragmentfraktion erwarten. Man findet aber weitaus mehr.

Einen weiteren Hinweis darauf, daß die Akzeptoraktivität des Fragments Ser 9/11-85 nicht allein auf die Verunreinigung mit tRNA^{Ser} zurückzuführen ist, gibt die Einbau-kinetik bei 35°C (Abb. 32). Das CCA-Ende des Fragments ist gegen Nucleaseverunreinigungen empfindlich. Wahrscheinlich sinkt darum die Akzeptoraktivität nach einem Maximum sehr schnell auf einen Wert, der der vorhandenen Menge tRNA^{Ser} entspricht. Unter gleichen Bedingungen erhält man für die Beladung reiner tRNA^{Ser} ein Plateau, und erst bei höheren Temperaturen (40°C - 44°C) kommt es wahrscheinlich durch Hitzeinaktivierung der Synthetase zu einer Abnahme der Akzeptoraktivität.

Dem Fragment Ser 9/11-85 fehlt der pG-Teil des Akzeptorstammes, und der verbleibende CCA-Teil ist nach dem Kleeblattmodell (Abb. 15) ein Einzelstrang aus 11 Nucleotiden. Wenn man das Heptanucleotid C-A-A-C-U-U-Gp (Ser 3-9) hinzugibt, können sich von den ursprünglich 7 Basenpaaren des Akzeptorstammes wieder 5 ausbilden (2G-C- und 3A-U-Paare). Dabei ist zu berücksichtigen, daß Ser 3-9 auch mit

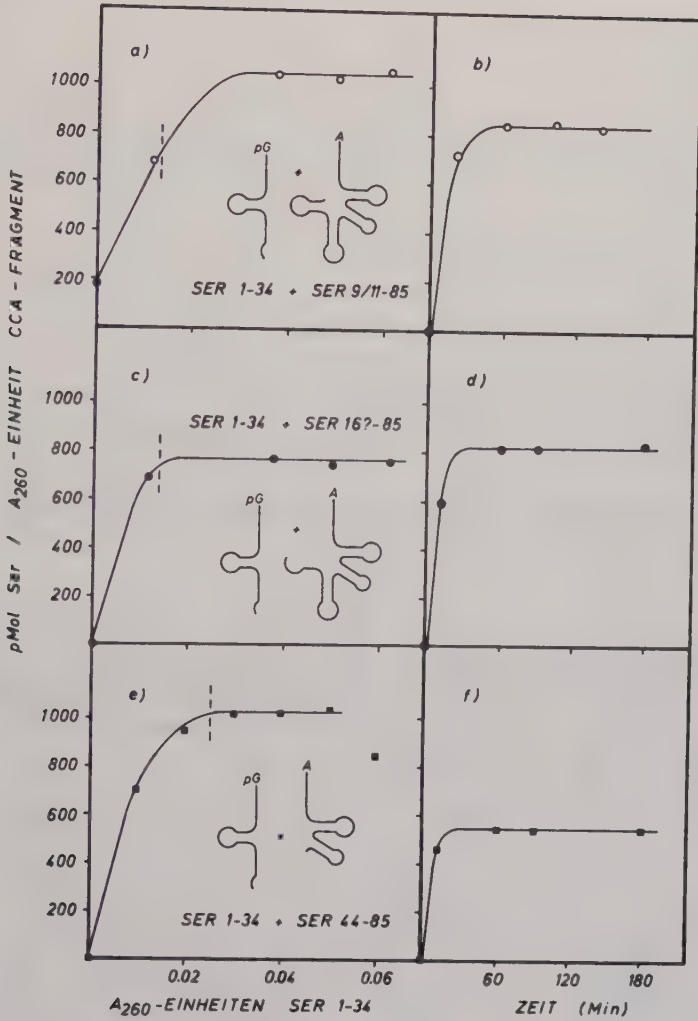


Abbildung 31: Vergleich der Akzeptoraktivität für Serin von Kombinationen verschiedener tRNA^{Ser}-Fragmente.

Abbildung 31 (Fortsetzung)

Das CCA-Fragment wird in a), c) und e) mit steigenden Mengen pG-Fragment 90 Min. bei 20°C und in b), d) und f) mit einem 2-3fachen Überschuß pG-Fragment verschieden lange Zeiten bei 20°C inkubiert. Weitere Einzelheiten sind in Kapitel 5.8 beschrieben.

- a) 0.03 A₂₆₀-Einheiten Ser 9/11-85 + Ser 1-34
- b) 0.03 A₂₆₀-Einheiten Ser 9/11-85 + 0.033 A₂₆₀-Einheiten Ser 1-34
- c) 0.028 A₂₆₀-Einheiten Ser 16?-85 + Ser 1-34
- d) 0.028 A₂₆₀-Einheiten Ser 16?-85 + 0.037 A₂₆₀-Einheiten Ser 1-34
- e) 0.03 A₂₆₀-Einheiten Ser 44-85 + Ser 1-34
- f) 0.025 A₂₆₀-Einheiten Ser 44-85 + 0.062 A₂₆₀-Einheiten Ser 1-34

An den Stellen, die durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet sind, liegt ein äquimolares Gemisch beider Fragmente vor.

sich selbst unter Ausbildung von 2G-C- und 4A-U-Paaren aggregieren kann. In Tabelle 10 ist der Einfluß verschiedener Konzentrationen Ser 3-9 auf die Akzeptoraktivität von Ser 9/11-85 beschrieben. Die höchsten Werte erhält man bei niedriger Temperatur und einem großen Überschuß an Ser 3-9.

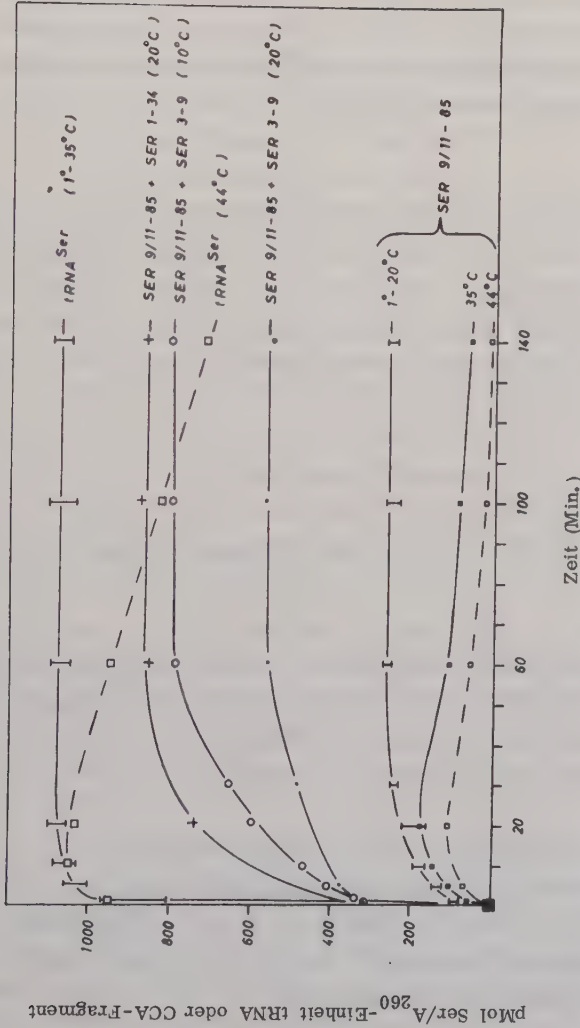


Abbildung 32: Zeitabhängigkeit der Akzeptoraktivität des Fragments Ser 9/11-85, der tRNA Ser und einiger

Fragmentkombinationen bei verschiedenen Temperaturen.

0,019 A₂₆₀-Einheiten Ser 9/11-85, 0,02 A₂₆₀-Einheiten tRNA Ser, 0,02 A₂₆₀-Einheiten Ser 9/11-85 + 0,026 A₂₆₀-Einheiten Ser 3-9 sowie 0,03 A₂₆₀-Einheiten Ser 9/11-85 + 0,033 A₂₆₀-Einheiten Ser 1-34 werden inkubiert. Abweichend von den in Kap. 5.8 beschriebenen Bedingungen wird die Fragmentkombination Ser 9/11-85 + Ser 3-9 bei 10°C 3 Stunden vorinkubiert.

Tabelle 10: Temperaturabhängigkeit der Akzeptoraktivität des Fragments Ser 9/11-85 und der Fragmentkombination Ser 9/11-85 + Ser 3-9

0.020 A₂₆₀-Einheiten Ser 9/11-85 werden allein oder mit 0.0026 bzw. 0.026 A₂₆₀-Einheiten Ser 3-9 3 Stunden bei 10°C vorinkubiert und anschließend bei verschiedenen Temperaturen mit Serin beladen. Die Zahlen in Klammern geben die molaren Verhältnisse an. Beim Einbau in Ser 9/11-85 bei 35°C erhält man kein Plateau (vgl. Abb. 32). Alle anderen Werte sind Plateauwerte.

Substrat	pMol Ser/A ₂₆₀ -Einheit Ser 9/11-85			
	10°C	15°C	20°C	35°C
Ser 9/11-85	260	270	260	80-160
Ser 9/11-85 + Ser 3-9 (1 : 1.4)	410	370	340	220
Ser 9/11-85 + Ser 3-9 (1 : 14)	810	700	550	310

3.13 Diskussion

3.13.1 Mechanismus des Abbaus von tRNAs und tRNA-Fragmenten durch Milz-PDE

Wenn die Nucleotidkette einer tRNA oder eines Fragments durch Milz-PDE zu Mononucleotiden abgebaut wird, so sind einige bestimmte Zwischenprodukte im analytischen Gel deutlich sichtbar (siehe Abb. 12; 16a, b; 18-20 und 28a, b). Die Fragmente der anderen Abbaustufen treten also nur in sehr geringen Konzentrationen auf, und zwar unter 0.5 % der tRNA-Konzentration (siehe Kap. 5.4, 10).

Für dieses Phänomen könnte man zwei verschiedene Erklärungen geben.

1. Nach der Hydrolyse einer Phosphodiesterbindung bleibt die Exonuclease an das Fragment gebunden und spaltet so lange weiter, bis sie an einer Stopstelle abdissoziiert. (Als Stopstellen bezeichnen wir dabei die Stellen einer Nucleotidkette, an denen der weitere Abbau stark verlangsamt ist).

2. Die einzelnen Zwischenstufen treten in freier Form auf, werden aber, sofern sie nicht mit einer Stopstelle beginnen, sehr schnell um ein weiteres Nucleotid verkürzt.

Im ersten Fall könnte die Konzentration jeder Zwischenstufe, die nicht mit einer Stopstelle beginnt, höchstens so groß werden wie die Enzymkonzentration. Im zweiten Fall müßte die Konzentration jeder Zwischenstufe unabhängig von der Enzymkonzentration etwa so groß werden wie die der tRNA.

Da unter den verschiedensten Bedingungen (siehe vor allem Kap. 3.3 und 3.4) immer nur eine geringe Anzahl von Reaktionsprodukten in größerer Konzentration als der Enzymkonzentration auftritt, ist es sehr wahrscheinlich, daß die erste Erklärung den Wirkungsmechanismus der Milz-PDE beim Abbau von tRNAs beschreibt. Die Milz-PDE baut also einige Bereiche der tRNA asynchron ab. Der Gesamtabbau wird allerdings durch den Mechanismus der Stopstellen synchronisiert. Bernardi und Cantoni (45) hatten auf Grund ihrer Experimente einen synchronen Abbau dephosphorylierter tRNA postuliert, und einen asynchronen für phosphorylierte tRNA. Der Mechanismus ist aber für beide Substrate gleich. Nur ist bei der phosphorylierten tRNA das 5'-Ende die stärkste Stopstelle (siehe Kap. 3.8), und man beobachtet darum noch nach langen Inkubationszeiten intakte tRNA.

Andere gut untersuchte Exonucleasen wie RNase II aus *E. coli* (59), DNA-Exonuclease I aus *E. coli* (17), Exonuclease aus Ehrlich Ascites Tumorzellen (60) und Polynucleotid-Phosphorylase aus *Micrococcus Lysodeikticus* (61) bzw. aus *E. coli* (62) bauen Nucleotidketten asynchron ab. Man hat hier keine Stopstellen entdecken können.

Woran kann es liegen, daß Milz-PDE an einigen Stellen der tRNAs bzw. der tRNA-Fragmente nur schwer weiterspaltend kann? Aus den Versuchen mit isolierten und kombinierten Hälften der tRNA^{Phe} (Abb. 28) sieht man, daß die Aktivierungsenergie zum Abbau einer Sequenz in einem Doppelstrang größer ist als die zum Abbau derselben Sequenz in einem Einzelstrang. Bei einem Doppelstrang muß die Bindungsenergie zwischen den H-Brücken überwunden werden, um das 5'-terminale Nucleo-

tid in engen Kontakt mit dem aktiven Zentrum der Milz-PDE zu bringen. Daraus resultiert wahrscheinlich die erhöhte Aktivierungsenergie für die Primäerspaltung in Doppelsträngen (siehe Abb. 14, 15, 17). Da der weitere Abbau eines Stranges in einer Doppelhelix ohne Unterbrechung stattfindet, destabilisiert der erste Komplex mit dem 5'-terminalen Nucleotid die Helix so, daß das "Herausdrehen" der folgenden Nucleotide aus dem helicalen Bereich erleichtert ist.

Wenn die Helix durch Mg^{++} -Ionen stabilisiert ist, kann die Milz-PDE genau wie RNase II aus *E. coli* (59) mit dem Substrat keinen Komplex mehr bilden, der Phosphodiesterbindungen spaltet (Kap. 3.3). Andere Exonucleasen wie Polynucleotid-Phosphorylase (62) und DNA-Exonuclease III aus *E. coli* (17) bauen aber auch unter diesen Bedingungen eine Doppelhelix ab.

Es gibt keine Hinweise darauf, daß Basenstapelung (70) in Einzelsträngen der tRNAs den Abbau durch Milz-PDE beeinflusst. Stopstellen in der hU-Schleife (Abb. 14, 15, 17) beruhen auf dem seltenen Nucleotid hUp, wie aus dem Vergleich der Abbaukinetiken von tRNA^{Tyr} und BH_3 -behandelter tRNA^{Tyr} hervorgeht (siehe Kap. 3.5). Ob direkt der Abbau des hUp oder einer Sequenz in der Nähe dieses Nucleotids erschwert ist, ist nicht eindeutig aus den Analysendaten (Kap. 3.10.2 und 3.10.4) zu ersehen. Da aber die Exonuclease zur Bindung an eine Nucleotidkette wahrscheinlich die Wechselwirkung mit den π -Elektronensystemen der heterocyclischen Basen benötigt, sollten direkt das hUp und vor allem das reduzierte hUp eine Stopstelle sein. Nach Abbildung 20 entsteht auch durch Ureidopropanolribosid eine stärkere Stopstelle als durch Dihydrouridin.

Da in der Sequenz der 5 S RNA aus *E. coli* keine seltenen Nucleotide vorkommen (48), deuten wahrscheinlich alle mit diesem Substrat beobachteten Stopstellen (Kap. 3.6) auf den Beginn von Doppelsträngen hin.

Nach den Längenbestimmungen einiger Fragmente, die beim Abbau dephosphorylierter tRNA^{Ser} (Abb. 16) und tRNA^{Tyr} (Abb. 18) sowie der Fragmente Phe 38-76 (Abb. 28f) und Ser 36-85 (Abb. 29) entstehen, bedingt wahrscheinlich das Nucleotid

Ψ p eine Stopstelle. Nach Röntgendaten ist im Nucleosid Ψ die C-C-Bindung zwischen Base und Ribose um $0.5 \text{ \AA}$ länger als die normale C-N-Bindung zwischen Base und Ribose bei allen anderen Nucleotiden (7). Während fast alle Nucleotide in einem Polynucleotid in Anti-Konformation vorliegen, sollte daher für Ψ p die Syn-Konformation vorherrschen (7). Das π -Elektronensystem könnte dann aus sterischen Gründen erst nach einem entsprechenden Konformationswechsel mit der Exonuclease eine gleiche Wechselwirkung eingehen wie andere Nucleotide. Da solch ein Konformationswechsel innerhalb eines Komplexes mit der Milz-PDE kaum vorstellbar ist, müßte es also an dieser Stelle des Abbaus zu einer Dissoziation zwischen Enzym und Substrat kommen.

3.13.2 Diskussion der Ergebnisse hinsichtlich der Erkennungsregion für Aminoacyl-tRNA-Synthetase

Die Ergebnisse für die Akzeptoraktivitäten der in Kapitel 3.12 untersuchten Fragmente und Fragmentkombinationen sind in Tabelle 11 zusammengefaßt. Mehrere Kombinationen (2, 3, 6, 9, 12, 14) enthalten mehr Nucleotide als zur Rekonstitution einer kompletten tRNA nötig sind. Die Beladung ist dann nicht so hoch wie für die entsprechende tRNA. Das liegt wohl mehr daran, daß ein Teil der Komplexe keine einer nativen tRNA vergleichbare räumliche Struktur besitzt, als daß die zusätzlichen Nucleotide einen Teil der Erkennungsregion verdecken. Gegen letztere Erklärung sprechen auch die 83 % Beladung der Kombination 12. Hier sind etwa 25 Nucleotide (hU-Stamm, hU-Schleife und ein Teil des Akzeptorstammes) doppelt vorhanden. Vielleicht sollte man einmal versuchen, tRNAs zu testen, die in definierten Bereichen Oligonucleotide gebunden haben (63, 64).

Betrachtet man die Ergebnisse für Kombinationen, bei denen im Vergleich zur tRNA einige Nucleotide fehlen, so sieht man, daß die Nucleotide 35 bis 43 der tRNA^{Ser} (Tab. 11, Nr. 16) für die Beladungsreaktion nicht notwendig sind. Dies steht in Einklang mit Versuchen an tRNA^{Phe} (28, 65) und tRNA^{Ala}_{II} (26) aus Hefe, bei denen auch große Teile des Anticodonstammes und der Anticodonschleife fehlen können,

ohne daß die Akzeptoraktivität verloren geht. Allerdings finden Mirzabekov et al. einen Verlust der Akzeptoraktivität, wenn zwei Nucleotide aus der Anticodonschleife der tRNA^{Val}_{Hefe} fehlen (24).

Wenn die Nucleotide 16-26 der tRNA^{Phe} fehlen (Tabelle 11, Nr. 8), mißt man nur noch eine geringe Aminoacylierung. In dieser Fragmentkombination kann sich kein hU-Stamm und damit vielleicht auch keine richtige Raumstruktur mehr ausbilden. Aus diesem Experiment geht also nicht eindeutig hervor, ob der hU-Stamm ein Teil der Erkennungsregion für die Synthetase ist oder nicht.

Ein Fehlen der Nucleotide 1 und 2 der tRNA^{Ser} (Tabelle 11, Nr. 11) verhindert nicht die Beladungsreaktion. Dies spricht gegen eine allgemeine Gültigkeit der Theorie von Schulman und Chambers (66), nach der die ersten drei Basenpaare im Akzeptorstamm essentielle Bestandteile der Erkennungsregion sind. Auch eine Fragmentkombination, bei der die ersten beiden Nucleotide am 5'-Ende der tRNA^{Met} aus E. coli fehlen, akzeptiert noch Methionin (36). Ein weiteres Gegenargument ist, daß tRNA^{Val}_{Ila}, tRNA^{Val}_{Iib} (71), tRNA^{Gly}_{III} (72) und tRNA^{Leu} (73) aus E. coli, die in homologen Systemen von verschiedenen Synthetasen erkannt werden, gerade an dieser Stelle identische Sequenzen haben. Nur die Ergebnisse von Mirzabekov et al. (67) stehen in Übereinstimmung mit der Akzeptorstammhypothese.

Besonders interessant in diesem Zusammenhang ist die Beladung des Fragments Ser 9/11-85 (Tabelle 11, Nr. 10, Abb. 32), die nicht allein auf einer kleinen Verunreinigung durch tRNA^{Ser} beruht (vgl. Kap. 3.12.2). Danach sollte ein intakter Akzeptorstamm nur für die Orientierung des terminalen Adenosins für die Veresterung mit Serin verantwortlich sein, und die spezifische Erkennungsregion für die Seryl-tRNA-Synthetase müßte in einem anderen Bereich der tRNA lokalisiert sein. Vergleicht man die Sequenzen von tRNA^{Ser}_{Hefe} (9), tRNA^{Ser}_{Rattenleber} (68) und tRNA^{Ser}_{E. coli} (69), die von einem Enzym beladen werden, so findet man identische Sequenzen nur im hU-Stamm. Dieser Teil ist auch im Fragment Ser 9/11-85 intakt, und könnte somit genau dieselben Wechselwirkungen mit der tRNA-Synthetase eingehen wie tRNA^{Ser}.

Tabelle 11: Akzeptoraktivität verschiedener Fragmente und Fragmentkombinationen

Die Ergebnisse der Abbildungen 30, 31 und 32 sind hier auf 1250 pMol Phe/A₂₆₀-Einheit tRNA^{Phe} (= 100 %) bzw. auf 1100 pMol Ser/A₂₆₀-Einheit tRNA^{Ser} (= 100 %) bezogen

Fragment bzw. Fragmentkombination		Aminosäureeinbau
1.	Phe 10/11-76	0 %
2.	Phe 10/11-76 + Phe 1-18	65 %
3.	Phe 10/11-76 + Phe 1-36	38 %
4.	Phe 16?-76	0 %
5.	Phe 16?-76 + Phe 1-18	34 %
6.	Phe 16?-76 + Phe 1-36	25 %
7.	Phe 27-76	0 %
8.	Phe 27-76 + Phe 1-18	< 2.5 %
9.	Phe 27-76 + Phe 1-36	51 %
10.	Ser 9/11-85 ^{†)}	22 %
11.	Ser 9/11-85 + Ser 3-9	65 %
12.	Ser 9/11 + Ser 1-34	83 %
13.	Ser 16?-85	0 %
14.	Ser 16?-85 + Ser 1-34	62 %
15.	Ser 44-85	0 %
16.	Ser 44-85 + Ser 1-34	46 %

†) Mit 5 % tRNA^{Ser} verunreinigt

Die Überlegungen zur Funktion des Akzeptorstammes in der tRNA^{Ser} können aber nicht verallgemeinert werden, da das Fragment Phe 10/11-76, dem im Vergleich zur tRNA^{Phe} nur der pG-Teil des Akzeptorstammes fehlt, nicht mit Phenylalanin beladen wird (Tabelle 11, Nr. 1).

3.13.3 Diskussion der Ergebnisse hinsichtlich der Tertiärstruktur der tRNA

Der Abbau durch Milz-PDE wird durch die Sekundärstruktur und die Sequenz des Substrates beeinflusst (siehe Kap. 3.13.1). Wenn ein Fragment beim Abbau einer tRNA in größeren Konzentrationen auftritt, und man ausschließen kann, daß ein seltenes Nucleotid wie hUp oder auch $\bar{\psi}$ p diese Stopstelle bedingt, so muß in der Tertiärstruktur der tRNA dieser Teil mit einer Doppelhelix beginnen (Kap. 3.13.1).

Bei fast allen Tertiärstrukturmodellen für die tRNA liegen die Achsen von zwei Stämmen des Kleeblattmodelles so übereinander, daß ein Strang ohne "Knick" von der ersten Helix in die nächste übergeht (6, 7). Die Milz-PDE könnte dann einen solchen Strang, der nach dem Kleeblattmodell zu zwei Stämmen gehört, ohne Unterbrechung vom 5'- zum 3'-Ende abbauen. Beim Übergang vom hU- zum Anticodonstamm beobachtet man bei allen untersuchten tRNAs eine Stopstelle, die nach der Analyse des Fragments Phe 27-76 (Kap. 3.10.3) nicht durch das Nucleotid $m^2_2\text{Gp}$, sondern durch den Beginn einer Doppelhelix hervorgerufen wird. Nur im Modell von Danchin (76), Connors et al. (77) und Fuller et al. (8, siehe Abb. 1b) ist der hU-vom Akzeptorstamm getrennt. Da aber die Struktur eines tRNA-Moleküls durch den Abbau des Akzeptor- und hU-Stammes schon stark verändert sein kann, sagt die Stopstelle zu Beginn des Anticodonstammes nichts Genaues über die Struktur der vorher abgebauten Sequenzen.

Unter diesem Gesichtspunkt können nur die Stopstellen, die zu Beginn des Abbaus beobachtet werden, Hinweise zur Tertiärstruktur der tRNA geben. Hierzu zählt die Stopstelle im Akzeptorstamm der tRNA^{Phe} (siehe Abb. 13 und 14). Mitten in einer Helix wird der Abbau unterbrochen. Nach der Sequenz sind keine seltenen Nucleoti-

de in diesem Bereich. Eine Erklärung gibt im Grunde nur das Tertiärstrukturmodell von Danchin (76) und Conners et al. (77). Es unterscheidet sich vom Modell in Abbildung 1b lediglich darin, daß die Achse des hU-Stammes nicht senkrecht, sondern parallel zur Längsachse des Moleküls liegt, und der Akzeptorstamm durch die relativ große hU-Schleife gefädelt ist. Dadurch müßte die Milz-PDE den Abbau des Akzeptorstammes an einer Stelle unterbrechen und könnte erst weiterreagieren, wenn sich der Rest des Akzeptorstammes "entfädelt" hat. Für dieses Tertiärstrukturmodell der tRNA^{Phe} spricht auch die hemmende Wirkung der beiden reduzierten Nucleotide hUp in der hU-Schleife auf den Abbau des Akzeptorstammes der tRNA^{Phe} (siehe Kap. 3. 5). Die Modifizierung in der hU-Schleife verändert vielleicht die Lage des Akzeptorstammes in dieser Schleife so, daß das 5'-Ende weniger exponiert ist als in der unreduzierten tRNA.

4. Trennung von Nucleinsäuren und Oligonucleotiden in Polyacrylamidgel

Erst nachdem die Elektrophorese in Polyacrylamidgel (Abk. PAA-Gel) sehr erfolgreich bei der Fraktionierung von Proteinen angewandt worden war (78), benutzte man diese Trenntechnik für Nucleinsäuren.

Zuerst untersuchten Richards et al. (79, 80) mit 10 %igem PAA-Gel 2 S bis 6 S Fraktionen, die bei der Isolierung von tRNA aus Hefe entstanden. Dann gelang Hjerten et al. (81) die Trennung größerer RNA aus ribosomalen Untereinheiten. Mehrere Arbeiten von Hannah Gould (82-85), Mc Phie et al. (86) und Hindley (87) schlossen sich an, in denen die Produkte partieller rRNA-Spaltungen durch T1- und Pankreas-RNase in PAA-Gel getrennt wurden. 2,4 %- bis 3,6 %ige Gele benutzten Loening (88, 89) zur Trennung ribosomaler 45 S Vorläufer-RNA aus Pflanzen von 28 S und 16 S RNA, sowie Peacock und Dingman (90) für den Nachweis mehrerer RNA-Spezies zwischen 4 S und 30 S in *E. coli*. Auch sehr große DNA und RNA vom Molekulargewicht 300 000 bis 3 000 000 konnte von Bishop et al. (91) auf niederprozentigen Gelen sehr gut getrennt werden.

4.1 Gelsystem zur Trennung von tRNA-Fragmenten

Nucleinsäuren werden im PAA-Gel hauptsächlich nach ihrem Molekulargewicht getrennt (80, 89, 91). Die Konzentration des Geles richtet sich also nach der Größe der zu trennenden Nucleinsäuren. Je größer die Konzentration an Acrylamid (AA) ist, desto dichter ist nach der Polymerisation das Knäuel der PAA-Ketten und desto kleiner sind die Poren im Gel (92). Wir selber hatten das spezielle Problem, Fragmente von tRNAs mit einer Kettenlänge zwischen 3 und 80 Nucleotiden und einem Molekulargewicht zwischen 1 000 und 27 000 voneinander zu trennen. Wir mußten also ein Gelsystem entwickeln, in das tRNA kaum einwandert und ein Mononucleotid sehr weit eindringt. Alle möglichen tRNA-Fragmente sollten sich dann dazwischen auftrennen.

Die gebräuchlichen 2 %- bis 10 %igen Gele bestehen durchweg aus einem Knäuel sehr wenig vernetzter PAA-Ketten. (Die Porenverteilung in solch einem Gel ist durch Abbildung 34a, s. Kapitel 4.2, dargestellt.) Verglichen mit einem tRNA-Molekül haben diese Gele große Poren. Für ein Gelsystem, in das tRNA gerade noch einwandern kann, muß die Zahl der zu großen Poren verringert werden. Man kann dies durch eine starke Erhöhung der Monomerkonzentration erreichen. 30 %- bis 40 %ige Gele sind aber sehr spröde und schlecht zu handhaben. Eine andere Möglichkeit besteht darin, die Vernetzerkonzentration zu erhöhen. Das Knäuel aus Polymerketten wird dadurch in ein Raumnetz mit definierteren Porengrößen umgewandelt (Kap. 4.2, Abb. 34b).

Es ist unverständlich, daß mehrere Autoren (93, 94) keine Beeinflussung der Porengröße durch den Vernetzer annehmen. Durch Vergleich der Wanderung von tRNA in verschiedenen vernetzten 15 %igen Gelen finden wir aber einen Einfluß der Vernetzerkonzentration auf die Porengröße. Andere Untersuchungen mit weniger konzentrierten Gelen bestätigen dies (95, 96).

Für die Vernetzerkonzentration gibt es eine obere Grenze, die von der Monomerkonzentration abhängt (Tabelle 11).

Tabelle 11: Polymerisation bei hohen Vernetzerkonzentrationen (97)

% AA	% Bis	<u>% Monomer</u> % Dimer	<u>Mol Monomer</u> Mol Dimer	Ergebnis
5.0	5.0	1 : 1	2 : 1	weißes, zerbröckelndes Polymerisat
8.0	4.0	2 : 1	4 : 1	
7.5	1.87	4 : 1	8 : 1	weiße, elastische Gele
11.2	1.87	6 : 1	13 : 1	
12.0	1.5	8 : 1	17 : 1	
12.0	1.0	12 : 1	26 : 1	durch- sichtige Gele
16.0	1.33	12 : 1	26 : 1	
18.0	1.5	12 : 1	26 : 1	

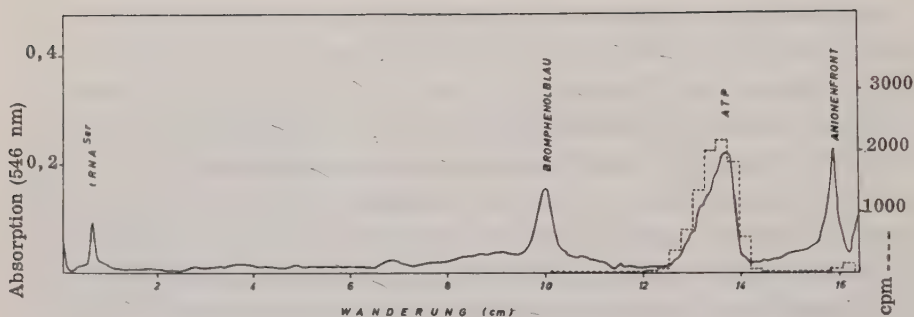


Abbildung 33: Trennung von tRNA^{Ser} und ATP im 18 %igen Gel

Eine ^{32}P -Markierung dient zur Kontrolle der Färbung, da ATP sehr schnell aus dem Gel diffundiert. (Färbedauer 1.5 Stunden)

Testet man ein Gemisch aus tRNA^{Ser} (85 Nucleotide) und ATP in verschiedenen Gel-systemen, so erhält man eine maximale Trennung in einem Gel aus 18 % Acrylamid und 1.5 % Bisacrylamid (Abbildung 33).

Bei späteren Versuchen stellte sich heraus, daß zur Trennung von großen tRNA-Fragmenten ein 12 %- oder 16 %iges Gel besser geeignet ist. Die Trennung von Oligonucleotiden und kleinen Fragmenten gelingt aber am besten in einem 16 %- bis 18 %igen Gel.

4.2 Theorie zur Porenverteilung

In einem wenig vernetzten Knäuel aus PAA-Ketten gibt es nach statistischen Gesetzen verteilt kleine und große Poren, denen man einen bestimmten Radius zuordnen

kann. Sehr große und sehr kleine Poren sind nur in geringer Anzahl vorhanden. Eine mittlere Porengröße kommt am häufigsten vor und läßt sich aus Wasserpermeabilitäts- und Diffusionsmessungen bestimmen (98).

Betrachtet man einen Gelquerschnitt sehr geringer Dicke, so hat von der Gesamtzahl N der Poren eine den größten Durchmesser $r_{\max}$. Dividiert man die Zahl P_r der Poren mit dem Radius r durch die Gesamtzahl N der Poren und trägt diese Werte gegen die möglichen Porenradien auf, so erhält man eine Porenverteilungskurve. Abbildung 34a zeigt ein Beispiel für ein wenig vernetztes Gel. Wenn in diesem Gel die Vernetzerkonzentration etwas erhöht wird, so ändert sich die Porenverteilung. Jedes Vernetzermolekül macht aus einer großen Pore zwei kleinere Poren. (Ein zusätzliches Monomermolekül würde die Acrylamidketten nur verlängern und durch sein Volumen eine Pore etwas verkleinern.) Als Ergebnis steigt die Gesamtzahl der Poren bei Abnahme der großen Poren. Das Maximum verschiebt sich daher zu kleineren Radien. Man erhält etwa eine Kurve wie in Abbildung 34b.

In einem Gradienten-Gel (99) ändert sich die Porenverteilung kontinuierlich von einem Querschnitt zum nächsten, und in einem Stufen-Gel (100) gibt es sprunghafte Änderungen beim Übergang vom niederprozentigen zum höherprozentigen Gel. Wir verwenden nur homogene Gele, und die Porenverteilungskurve ist dann für jeden Querschnitt gleich.

Für ein bestimmtes homogenes Gel ist $\frac{dP_r}{dr}$ eine Funktion des Porenradius r .

$$[1] \quad \frac{dP_r}{dr} = g(r)$$

Die Porenverteilung ist dann durch folgende Gleichung bestimmt:

$$[2] \quad \frac{P_r}{N} = \frac{1}{N} \int g(r) dr$$

Genauso wie man einer Gelpore einen Radius zuordnen kann, hat jedes Nucleinsäuremolekül während der Elektrophorese im Gel einen effektiven Radius (101), der be-

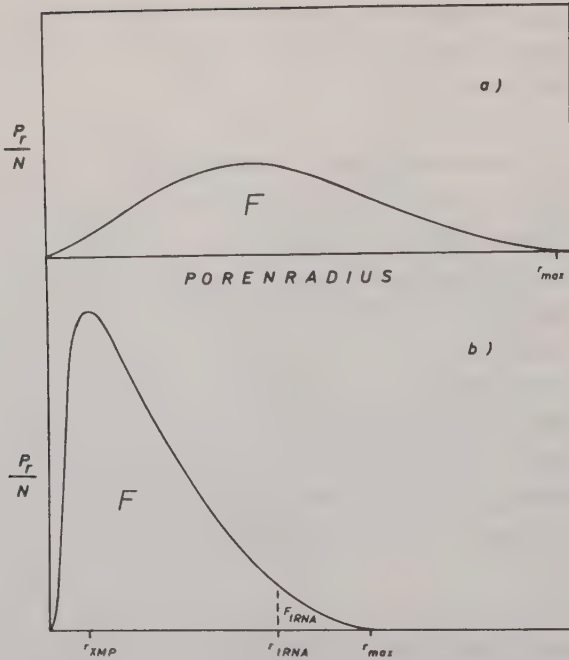


Abbildung 34: Porenverteilungskurven in einem Gelquerschnitt sehr geringer Dicke

a) für ein Knäuel sehr wenig vernetzter Polymerketten

b) für ein Raumnetz mit hoher Vernetzerkonzentration

N: Gesamtzahl der Poren in einem Querschnitt

P_r : Zahl der Poren mit einem bestimmten Radius r in einem Querschnitt

r_{XMP} : Radius der Poren, durch die gerade noch ein Mononucleotid wandern kann

r_{tRNA} : Radius der Poren, durch die gerade noch ein tRNA-Molekül wandern kann

r_{max} : größter Porenradius

F_{tRNA} : Anteil der Poren, durch die tRNA wandern kann

stimmt, durch welchen Anteil von Poren an der Gesamtzahl der Gelporen dieses Molekül wandern kann. Je kleiner eine Nucleinsäure ist, desto größer ist dieser Anteil, und desto größer ist ihre elektrophoretische Beweglichkeit (102, 103).

Für eine bestimmte Nucleinsäure hängt dieser Anteil von der Zusammensetzung des Geles ab, das heißt von der Monomer- und Vernetzerkonzentration sowie von den Polymerisationsbedingungen. Diese drei Parameter bestimmen nämlich die Gesamtzahl der Poren, den Radius der größten Pore und die Funktion g (Gleichung [1]). Für jeden Querschnitt eines Geles läßt sich der Anteil F_{tRNA} (Abb. 34b) an Poren, durch die gerade noch tRNA wandern kann, errechnen, wenn die Gesamtzahl N der Poren in diesem Querschnitt, die Funktion g und der effektive Radius r_{tRNA} eines tRNA-Moleküls bekannt sind.

$$[3] \quad F_{tRNA} = \frac{1}{N_0} \int_0^{r_{max}} g(r) dr^2 - \frac{1}{N_0} \int_0^{r_{tRNA}} g(r) dr^2$$

Das erste Doppelintegral dividiert durch N entspricht der Fläche F in Abbildung 34 und hat den Wert 1.

$$[4] \quad F_{tRNA} = 1 - \frac{1}{N_0} \int_0^{r_{tRNA}} g(r) dr^2$$

Für ein 18 %iges Gel ist F_{tRNA} sehr klein. Nach Abbildung 33 wandert $tRNA^{Ser}$ in diesem Gel nur 5 % von der Strecke, die ATP zurücklegt. Unter der Voraussetzung, daß ATP durch alle Poren des Gels wandern kann, F_{ATP} also 1 ist, ist F_{tRNA} etwa 0,05. Dies stimmt nur ungefähr, da ATP eine größere spezifische Ladung als tRNA hat. Würde man die Laufstrecken von Nucleinsäuren bekannter Größe mit der des cycloAMP vergleichen, so ließe sich die Porenverteilungskurve experimentell bestimmen.

4.3 Elektrophoretische Beweglichkeit und R_B -Wert von Nucleotidketten unterschiedlicher Länge

Die elektrophoretische Beweglichkeit eines geladenen Moleküls in einem bestimmten

System ist durch folgende Gleichung definiert (104):

$$[5] \quad u = x \cdot t^{-1} \cdot E^{-1} (\text{cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ sec}^{-1})$$

Die Wanderungsstrecke x wird in cm gemessen, die Dauer t der Elektrophorese in sec. Viel schwieriger ist die Bestimmung der elektrischen Feldstärke E .

Peacock und Dingman (105) arbeiten mit der gleichen elektrophoretischen Zelle wie wir. Sie nehmen an, daß die Gesamtspannung im 17 cm langen Trenngel abfällt. Die Strecke von etwa 14 cm zwischen den Elektroden und dem Gel wird von ihnen unberechtigt vernachlässigt. Da sie im kontinuierlichen Puffersystem mit niederprozentigen Gelen arbeiten, fällt die Gesamtspannung fast gleichmäßig über 31 cm ab, denn eine dünne Gelmatrix erhöht nur unbedeutend den Widerstand. Bei hochprozentigen PAA-Gelen, wie wir sie verwenden, ist das anders, und der Widerstand des Geles muß zusätzlich bestimmt werden. Er errechnet sich aus der Differenz des Gesamtwiderstandes der Zelle und den nicht zu vernachlässigenden Widerständen zwischen Kathode und Trenngelanfang, sowie Trenngelende und Anode. Die Ergebnisse für die verschiedenen Gelsysteme sind in Tabelle 13 beschrieben.

Da wir mit diskontinuierlichen Puffersystemen (106) arbeiten, ist für die Wanderung der Nucleinsäuren die elektrische Feldstärke zwischen Kathode und Anionenfront entscheidend. Diese ändert sich im Verlauf der Elektrophorese, da die Anionenfront wandert. Errechnet wird die elektrische Feldstärke bei Eintritt der Anionenfront ins Trenngel, und am Ende der Elektrophorese. Da die Differenzen nicht sehr groß sind, wird der Mittelwert genommen, und zwar mit der Annahme, daß die Änderung ungefähr linear ist. Die Einzelnen Daten, die zur Berechnung der Feldstärke nötig waren, sind in Tabelle 13 zusammengefaßt. (Fischer und Dingman (107) bestimmen u mit Hilfe der spezifischen Leitfähigkeit des Gelpuffers und der Stromdichte. Auch sie mitteln die 10 %igen Schwankungen.)

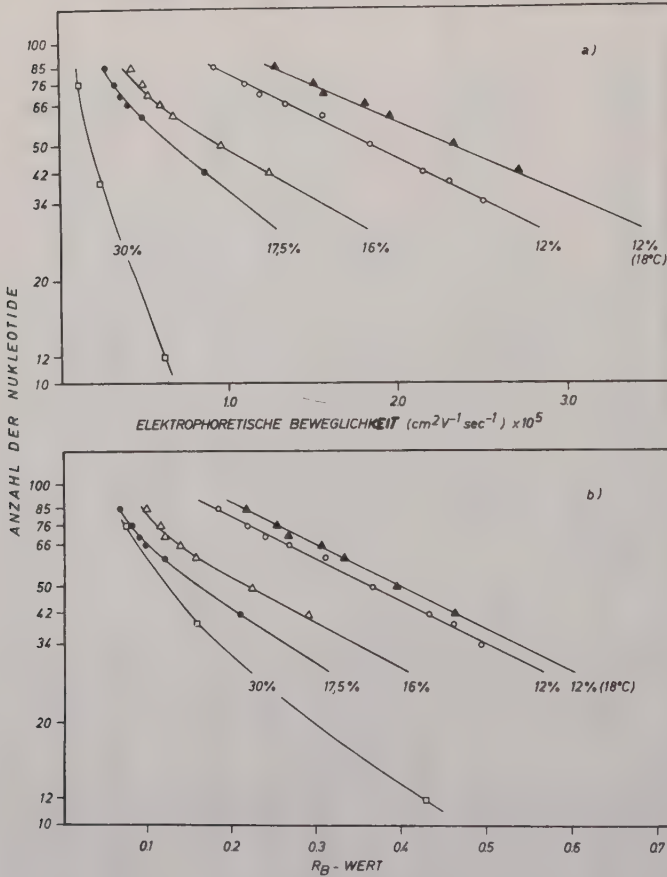
Trägt man von verschiedenen Fragmenten die nach Gleichung [5] erhaltenen Werte für u gegen den Logarithmus der Kettenlänge auf, so ergibt sich für die verschie-

Tabelle 13: Meßdaten für verschiedene Gelsysteme zu Beginn (erste Zahl) und am Ende (zweite Zahl) der elektrophoretischen Trennung.

Die Entfernung zwischen Kathode und Trenngelanfang ist 11,5 cm und zwischen Trenngelende und Anode 2,8 cm. Das Trenngel hat eine Länge von 17 cm. In dem verwendeten Puffersystem ist der Widerstand zwischen Kathode und Trenngelanfang 2000 Ohm und zwischen Trenngelende und Anode 500 Ohm.

	12 % (18°)	12 % (4°)	16 % (4°)	17,5 % (4°)	30 % (4°)
Gesamtwiderstand der Zelle (Ohm)	3500/4700	3620/5000	4500/5780	4900/5450	7100/8000
Wanderung der Anionenfront im Trenngel (cm)	0/16	0/15	0/17	0/14	0/9
Widerstand Anionenfront bis Trenngelende (Ohm)	1000/60	1120/130	2000/0	2400/420	4600/2170
Widerstand Anionenfront bis Anode (Ohm)	1500/560	1620/630	2500/500	2900/920	5100/2670
Widerstand Kathode bis Anionenfront (Ohm)	2000/4140	2000/4370	2000/5280	2000/4530	2000/5330
Widerstand Kathode bis Anionenfront (% Gesamtwiderstand)	57,1/88,0	55,3/87,5	44,5/91,4	40,8/83,1	28,2/66,6
Gesamtspannung (Volt)	280/310	370/400	450/520	450/480	580/600
Spannungsabfall Kathode bis Anionenfront (Volt)	160/273	204/350	200/475	184/399	164/400
Feldstärke Kathode bis Anionenfront ($\frac{V}{cm}$)	13,9/9,9	17,7/13,2	17,4/16,7	16,0/15,6	14,3/19,5
Mittlere Feldstärke während der Elektrophorese ($\frac{V}{cm}$)	11,9	15,5	17,0	15,8	16,9
Dauer der Elektrophorese (sec)	$1,8 \cdot 10^4$	$1,35 \cdot 10^4$	$1,71 \cdot 10^4$	$1,35 \cdot 10^4$	$1,98 \cdot 10^4$

Abbildung 35: Einfluß der Kettenlänge einer Nucleinsäure auf ihre elektrophoretische Beweglichkeit und ihren R_B -Wert in verschiedenen Gelsystemen



Je 0.03 - 0.1 A_{260} -Einheiten $tRNA^{Ser}$, $tRNA^{Phe}$, Ser 16?-85, Phe 10/11-76, Phe 16?-76, Phe 27-76, Ser 42-85, Phe 38-76, Ser 1-34 und Phe 31-42 werden in Gelen verschiedener PAA-Konzentration getrennt. Wenn nicht anders angegeben, ist die Temperatur 4°C. Der Logarithmus der Kettenlänge ist in

Abbildung 35 (Fortsetzung)

- a) gegen die elektrophoretische Beweglichkeit aufgetragen (Ausrechnung siehe Tabelle 13) und in
- b) gegen den R_B -Wert.

Die Kurvenscharen in a) unterscheiden sich in bezug auf Steigung und Abstand von denen in b), weil der Einfluß der PAA-Konzentration und der Temperatur auf die Beweglichkeit des Bromphenolblau offensichtlich anders ist als auf Nucleinsäuren.

denen Gelsysteme eine Gerade (Abbildung 35 a). Umgekehrt kann man dann aus der elektrophoretischen Beweglichkeit die Länge einer Nucleinsäure abschätzen. Dieses Verfahren ist allerdings etwas kompliziert.

Wenn man dagegen Bromphenolblau als Marker mitlaufen läßt, dessen Wanderungsstrecke genau wie die einer Nucleinsäure von der Dauer und der Feldstärke der Elektrophorese abhängt, ist das schnell zu bestimmende Verhältnis der Wanderungsstrecken ein Maß für die elektrophoretische Beweglichkeit einer Nucleinsäure. Trägt man diese R_B -Werte von bekannten Fragmenten gegen den Logarithmus der Kettenlänge auf, so erhält man für die verschiedenen Gelsysteme Eichgeraden zur Längenbestimmung von tRNA-Fragmenten (Abb. 35b). Voraussetzung ist natürlich, daß 7 M Harnstoff in den Gelen ausreicht, um die Fragmente vollständig zu denaturieren. Die Wanderung einer Nucleinsäure im Gel ist nämlich auch von ihrer Struktur abhängig (89, 91, 105, 107-110). Nucleinsäuren haben aber in 6.4 M Harnstoff wenn überhaupt nur noch geringe Reste an Sekundärstruktur (111). Vielleicht läuft aus solch einem Grund das Fragment Phe 38-76 (39 Nucleotide) in hochprozentigen Gelen (Abb. 4) schneller als das Fragment Phe 1-36 (36 Nucleotide). Alle anderen getesteten Fragmente verhalten sich aber normal. Die lineare Abhängigkeit der Wanderungsstrecke vom Logarithmus des Molekulargewichts gilt auch in 2 %- bis 10 %igen Gelen für Nucleinsäuren mit einem Molekulargewicht zwischen 10 000 und 3 000 000 (80, 89, 91, 105).

Bei kleinen R_B -Werten beobachtet man oft genau wie in Abbildung 35 ein Abweichen von der Linearität (86, 105). Dieser Effekt wird in Kapitel 4.5 diskutiert.

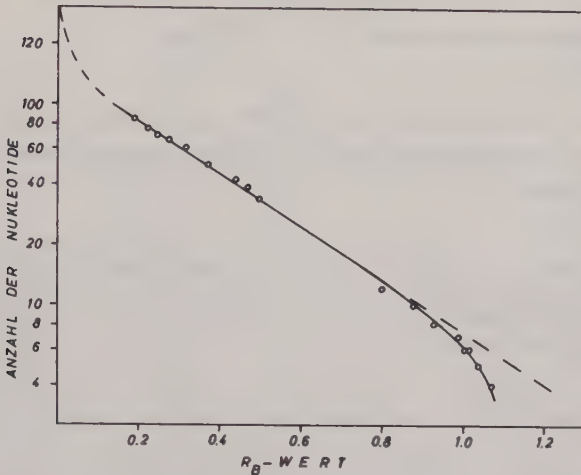
4.4 Probleme der Trennung und Kettenlängenbestimmung von Oligonucleotiden in Polyacrylamidgel

Der pH-Wert während der Elektrophorese liegt zwischen 8 und 9. Bis auf wenige Ausnahmen sind dann alle Basen einer Nucleinsäure ungeladen. Vorhandene endständige Phosphatgruppen haben 2 negative Ladungen, während alle anderen Phosphatgruppen eine negative Ladung zur Gesamtladung beitragen. tRNAs und größere Oligonucleotide haben praktisch gleiche spezifische Ladungen und werden darum nur nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Für kleine Oligonucleotide gilt das nicht mehr. Je nachdem, ob sie am 3'- oder am 5'-Ende oder an beiden eine Phosphatgruppe tragen oder gar kein endständiges Phosphat besitzen, hat ihre spezifische Ladung einen anderen Wert. Das sollte sich bei einer Elektrophorese auswirken.

Für Oligonucleotide, die wie tRNAs ein endständiges Phosphat mit 2 negativen Ladungen haben, wird die spezifische Ladung mit sinkender Kettenlänge bis zum Mononucleotid immer größer. Sie sollten also während der Gelelektrophorese schneller wandern, als man es nach ihrer Kettenlänge erwarten würde. Aber genau das Gegenteil ist der Fall (Abbildung 36). Dies unerwartete Ergebnis ist durch die Lage des Maximums der Porenverteilungskurve (Abb. 34b) in dem verwendeten 12 %igen Gel zu erklären und wird in Kapitel 4.5 genauer diskutiert. Die Eichgerade für ein 12 %iges Gel gilt daher nur für R_B -Werte zwischen 0.1 und 0.8.

Die Beweglichkeit der Oligonucleotide wird durch viele Parameter beeinflusst. Die wichtigsten sind in Tabelle 14 zusammengefaßt. Gemessen an den R_B -Werten haben zwei zusätzliche negative Ladungen eines Oligonucleotids durch endständiges Phosphat denselben Effekt wie die Verkürzung um 2 - 3 Nucleotide (Tabelle 14 a), hat ein hoher Gehalt an Pyrimidinen denselben Effekt wie die Verkürzung um 1 Nucleotid (Tabelle 14 b) und hat eine positive Ladung denselben Effekt wie die Verlängerung um 1 Nucleotid (Tabelle 14 c).

Abbildung 36: Verhältnis von Kettenlänge und R_B -Wert bei großen tRNA-Fragmenten und Oligonucleotiden



Aufgetragen sind die R_B -Werte der Referenzsubstanzen der 12 %igen Gele von Abb. 35 und Abb. 37 gegen den Logarithmus der Kettenlänge.

Trotz der Vielfalt der Einflüsse auf die Beweglichkeit der Oligonucleotide lassen sich für diesen Bereich unter bestimmten Voraussetzungen Eichgeraden ermitteln.

Bei der Spaltung von Nucleinsäuren mit T1-RNase oder Pankreas-RNase entstehen fast ausschließlich Oligonucleotide mit einem endständigen Phosphat. Für diese Gruppe von Oligonucleotiden findet man eine lineare Abhängigkeit des R_B -Wertes von der Kettenlänge (Abbildung 37) und nicht vom Logarithmus der Kettenlänge wie bei größeren tRNA-Fragmenten (Abb. 35). Dies liegt wahrscheinlich an den Porenverteilungskurven der Gele (siehe Kap. 4.5). Die Länge von Oligonucleotiden ist somit unter Berücksichtigung der in Tabelle 14 genannten Parameter aus dem R_B -Wert gut abschätzbar.

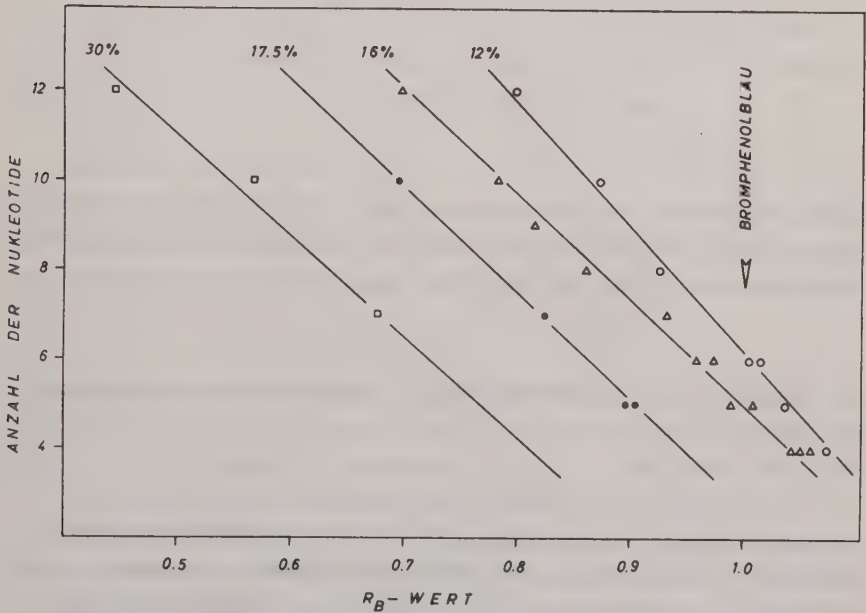
Tabelle 14: Parameter, die den R_B -Wert von Oligonucleotiden beeinflussen.

- a) negative Ladungen endständiger Phosphatgruppen
b) ungewöhnliches Verhältnis von Purin- zu Pyrimidinbasen
c) positive Ladung in m^1A

Die spezifische Ladung ist angegeben als Verhältnis von Ladung bei einem pH-Wert 8-9 zur Anzahl der Nucleotide. Die Zahlen in Klammern beziehen sich auf das verwendete Trenngelsystem.

	Oligonucleotid	Spez. Ladung	R_B -Wert	
a)	pGpCpGpGpApUpUpApm ² G > p	1. 20	0. 862	(16 %)
	m ⁶ ApUpCpCpApCpApGp	1. 12	0. 849	(16 %)
	CpApCpCpA	0. 80	0. 853	(16 %)
	CpApApCpUpUpGp	1. 14	0. 824	(17, 5 %)
	CpCpCpG	0. 75	0. 848	(17, 5 %)
	CpApApCpUpUpGp	1. 14	0. 885	(16 %)
	CpApApCpUpUpG	0. 86	0. 795	(16 %)
	GmpApApYpApψ	0. 83	0. 716	(17, 5 %)
	ApiApApψpCpUpUpUpUmpGp	1. 10	0. 658	(17, 5 %)
	GmpApApYpApψ	0. 83	0. 570	(30 %)
	ApiApApψpCpUpUpUpUmpGp	1. 10	0. 566	(30 %)
b)	ApApApG	0. 75	0. 790	(17, 5 %)
	CpCpCpG	0. 75	0. 848	(17, 5 %)
	hUphUphUpApApGp	1. 17	0. 936	(16 %)
	CpCpCpCpCpGp	1. 17	0. 968	(16 %)
	CpCpApApGp	1. 20	0. 976	(16 %)
c)	m ¹ ApUpCpCpApCpApGp	1. 00	0. 820	(16 %)
	m ⁶ ApUpCpCpApCpApGp	1. 12	0. 849	(16 %)
	CpCpApApGp	1. 20	0. 976	(16 %)
	m ¹ ApCpUpCpGp	1. 00	0. 936	(16 %)
	hUphUphUpApApGp	1. 17	0. 936	(16 %)

Abbildung 37: Beziehung zwischen Kettenlänge und R_B -Wert für Oligonucleotide mit einem terminalen Phosphat



Die Zahlen in Klammern geben die Trenngelsysteme an, in denen die folgenden Oligonucleotide bei 4°C getestet wurden.

A-Cm-U-Gm-A-A-Y-A- Ψ -m ⁵ C-U-Gp	(30 %, 16 %, 12 %)
A-iA-A- Ψ -C-U-U-U-Um-Gp	(30 %, 17,5 %, 16 %, 12 %)
Ψ -A-iA-A- Ψ -C-U-U-Gp	(16 %)
C-A-A-C-U-U-Gp	(30 %, 17,5 %, 16 %)
m ⁶ A-U-C-C-A-C-A-Gp	(16 %, 12 %)
A-U-U-U-A-m ² G > p	(16 %, 12 %)
C-U-U-U-Gp	(17,5 %, 12 %)
C-U-C-U-Gp	(17,5 %)
C-C-A-A-Gp	(16 %)
C-U-C-A-Gp	(16 %)

Abbildung 37: (Fortsetzung)

T-Ψ-C-Gp	(16 %, 12 %)
hU-hU-Gm-Gp	(16 %)
C-A-A-Gp	(16 %)

Birnboim und Glickmann (112) trennen Tetra- bis Nonanucleotide in 8 %igem PAA-Gel bei pH 2.3 und pH 3.4. Dadurch erhalten sie in dem großporigen Gel keine Auftrennung nach der Molekülgröße sondern nach der Basenzusammensetzung. Cytidinreiche Oligonucleotide wandern auf Grund der geringen spezifischen Ladung am langsamsten.

Eine Trennung von Desoxyoligonucleotiden nach der Molekülgröße finden Elson und Jovin (113) bei pH 8.9 in einem Gel aus 20 % AA und 3 % Bis. Sie geben aber leider keine R_B -Werte an.

Bei Gould et al. (114) findet man genaue Angaben der R_B -Werte von Nucleinsäurefragmenten mit einem Molekulargewicht zwischen 330 (UMP) und 220 000 für ein Gel aus 15 % AA und 0.15 % Bis. Die R_B -Werte liegen zwischen 1.75 und 0.1 und zeigen über den ganzen Bereich eine lineare Abhängigkeit vom Logarithmus des Molekulargewichts. Die Autoren sagen, daß eine Trennung der Oligonucleotide nur nach der Molekülgröße erfolgt. Sie vergessen dabei den Einfluß der spezifischen Ladung auf die Wanderung im elektrischen Feld. Der Trennfaktor der kleinen Oligonucleotide in diesem wenig vernetzten Gel ist nämlich gerade die spezifische Ladung. Die Porenverteilungskurve ist bei der geringen Vernetzerkonzentration relativ flach (Abb. 34 a), und der Anteil von Poren, durch die ein Mononucleotid wandern kann, ist praktisch gleich. Das Mononucleotid hat aber eine größere spezifische Ladung, und nur darum wandert es schneller. Allerdings ist der mit 1.75 angegebene R_B -Wert für UMP etwas unwahrscheinlich. Nach unseren Erfahrungen mit einem fast gleichen Gelyp (15 % AA, 0.2 % Bis) ist der R_B -Wert der Anionenfront 1.3. Kein Molekül wandert während der Elektrophorese schneller als diese Anionen.

4.5 Theorie zu den Eichgeraden

Der R_B -Wert gibt das Verhältnis der Wanderungsstrecke einer Nucleinsäure zu der des Bromphenolblau an. Die Wanderungsstrecke ist nach Gleichung [5] von der Dauer t der Elektrophorese, der Feldstärke E und der elektrophoretischen Beweglichkeit u_N der Nucleinsäure bzw. u_B des Bromphenolblau abhängig.

$$[6] \quad R_B = \frac{u_N \cdot t \cdot E}{u_B \cdot t \cdot E}, \quad R_B = \frac{u_N}{u_B}$$

Warum besteht über einen großen Bereich eine lineare Abhängigkeit des R_B -Wertes vom Logarithmus der Kettenlänge (Abb. 35), und warum gilt das nicht mehr für sehr langsam und sehr schnell wandernde Nucleinsäuren (Abb. 36)?

Die elektrophoretische Beweglichkeit u_N einer Nucleotidkette in PAA-Gel ist von folgenden Parametern abhängig (Kapitel 4.2 und 4.3):

- r_N = effektiver Radius der Nucleotidkette
- F_N = Zahl der Poren mit gleichem oder größerem Radius r , dividiert durch die Gesamtzahl der Poren
- Q_N = spezifische Ladung der Nucleotidkette
- k = Ionenkonzentration in der Umgebung der Nucleotidkette
- l = Konzentration anderer gelöster Moleküle im Gel
- T = Temperatur während der Elektrophorese

" r_N " ist unter der Annahme, daß in 7 M Harnstoff die Nucleotidketten vollständig denaturiert sind, eine Funktion der Anzahl Z von Nucleotiden, und wird durch die Faltungsmöglichkeiten bestimmt. Richards und Lecanidou (117) kommen für Nucleinsäuren mit großem Molekulargewicht M zu der Gleichung $r_N = 0.0117 \cdot M^{0.54}$ und finden für alternierende Oligomere $(dAdT)_n$ mit $n = 4-25$ Proportionalität zwischen r_N und $\sqrt{n}$. Sie benutzen dabei die Ergebnisse von Bishop et al. (91) sowie Elson und Jovin (113).

" F_N " ist durch die Porenverteilung (Kapitel 4.2) und den effektiven Radius r_N bestimmt.

$$[7] \quad F_N = 1 - \frac{1}{N} \int_0^{r_N} \int g(r) dr^2$$

" Q_N " ist für große Nucleinsäuren konstant und für Oligonucleotide (Tabelle 14) von der Kettenlänge und der Anzahl der Phosphatgruppen abhängig.

k , l und T sind für alle Nucleotidketten während der Elektrophorese konstant.

Für ein homogenes Gel gilt dann:

$$[8] \quad u_N \sim F_N \cdot Q_N$$

Und da die elektrophoretische Beweglichkeit u_B des Bromphenolblau in einem bestimmten Gel konstant ist, ergibt sich aus Gleichung [6] und [8]:

$$[9] \quad R_B = C \cdot F_N \cdot Q_N$$

C ist eine für jedes Gelsystem verschiedene Konstante.

Wenn Abbildung 34 b im Prinzip die Porenverteilung der verwendeten Gele wieder-gibt, sind die am Beginn dieses Kapitels gestellten Fragen zu beantworten.

Der R_B -Wert wird nach [1], [7] und [9] durch den Differentialquotienten dP_r/dr beeinflusst.

Zwischen r_{XMP} und r_{tRNA} ist dP_r/dr negativ und über einen großen Bereich annähernd konstant. Bei sehr großen Porenradien wird der Differentialquotient größer. Nucleinsäuren, die nur durch sehr große Poren wandern können, haben daher einen etwas größeren R_B -Wert als nach den Eichgeraden erwartet wird (Abbildung 35 b).

Im Maximum der Porenverteilungskurve ist $dP_r/dr = 0$. In diesem Bereich wird der Differentialquotient also ständig kleiner. Oligonucleotide, die durch Poren mit

Radialen im Bereich des Maximums wandern können, sollten auf Grund ihres effektiven Radius langsamer wandern als nach den Eichgeraden. Die spezifische Ladung muß aber auch berücksichtigt werden (Tabelle 14). Abbildung 36 zeigt aber, daß für Oligonucleotide mit terminalem Phosphat in hochvernetzten Gelen der erste Effekt überwiegt.

Es gibt also für jedes Gelsystem in einem gewissen Bereich eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichts und dem R_B -Wert. Dieser Bereich ist abhängig von der Porenverteilungsfunktion (Kapitel 4. 2).

4. 6 Quantitative Auswertung von Densitogrammen

Für die Flächenbestimmung von Gipfeln in Densitogrammen gibt es mehrere Methoden (118, 119). In Abbildung 39 werden zwei davon miteinander verglichen. Dabei stellt sich heraus, daß die aufwendige planimetrische Methode (Abb. 39b) einer Schnellmethode nicht überlegen ist, bei der die Gipfelbreite auf halber Höhe mit der Gipfelhöhe multipliziert wird (Abb. 39 c). Ein wichtiger Punkt für die Auswertung ist das Festlegen der Basislinie s eines Gipfels (Abb. 39 a), da der Untergrund nicht konstant ist. Benötigt man die getrennte Auswertung von zwei Substanzen, die im Gel so eng zusammenlaufen, daß im Densitogramm ein Doppelgipfel entsteht, bestimmt man in der angedeuteten Weise (Abb. 39a) jeweils die Fläche der Gipfelhälfte, die durch den Nachbargipfel nicht beeinflusst ist und multipliziert das Ergebnis mit 2.

Wie die Geraden in Abbildung 39 b und c zeigen, gilt das Lambert-Beer'sche Gesetz für Konzentrationen zwischen 0.02 und 0.3 A_{260} -Einheiten pro 1 cm Tasche. Versuche mit höheren Konzentrationen zeigen ein beträchtliches Abweichen von der Geraden.

Beim Färben ist zu beachten, daß der Farbstoff bis in die Mitte des Geles diffundiert. Dies dauert bei einem 17.5 %igen Gel, das 3.3 mm dick ist, über 30 Stunden. Bei einem 12 %igen Gel reichen 24 Stunden. Während dieser Zeit diffundieren

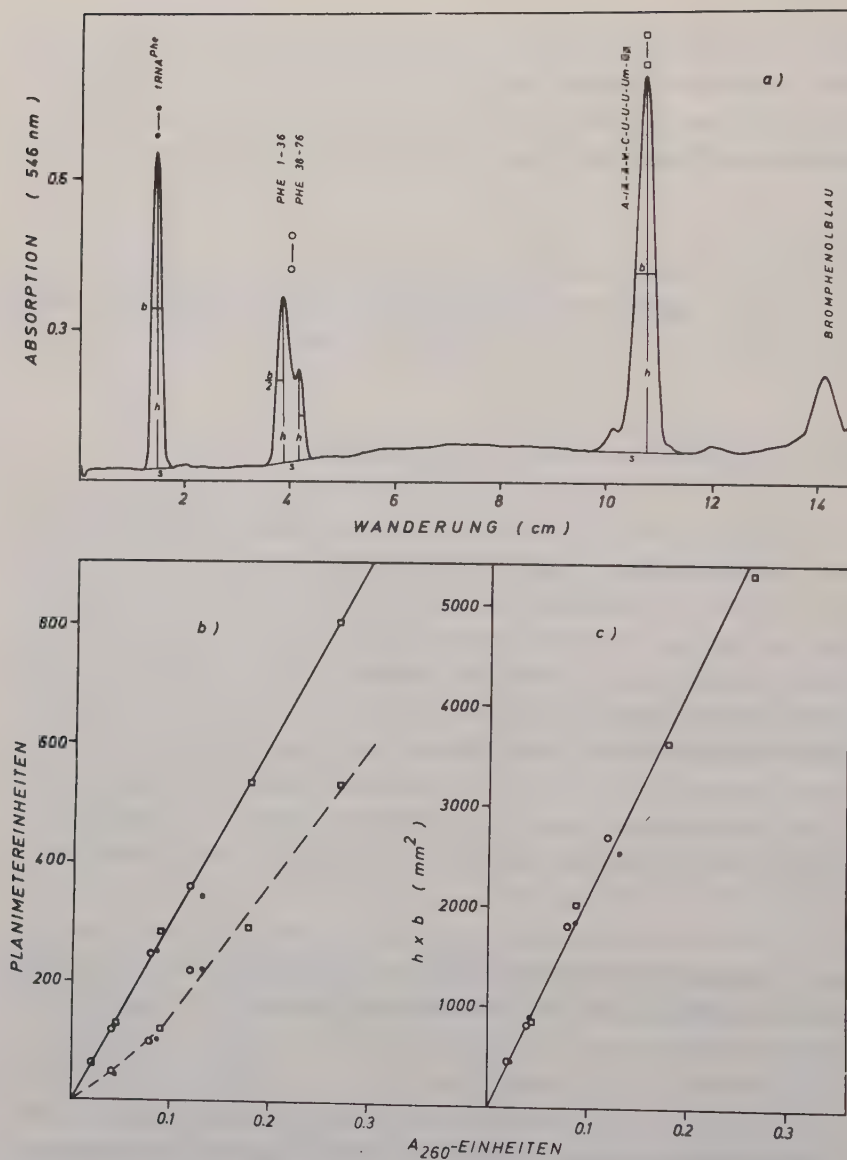


Abbildung 39: Quantitative Auswertung von Gipfflächen in Densitogrammen

Abbildung 39 (Fortsetzung)

Steigende A_{260} -Einheiten von Referenzsubstanzen werden im 16 %igen Gel (4°C , 1 cm Tasche) getrennt. Die Flächen unter den Gipfeln in Densitogrammen bestimmt man nach zwei Methoden und trägt die dabei erhaltenen Werte gegen die eingesetzten A_{260} -Einheiten auf.

- a) Densitogramm der elektrophoretischen Trennung von 0.044 A_{260} -Einheiten tRNA^{Ser}, 0.04 A_{260} -Einheiten eines Gemisches aus den Fragmenten Phe 1-36 und Phe 38-76, sowie 0.09 A_{260} -Einheiten des Decanucleotids A-iA-A-W-C-U-U-U-Um-Gp

s = Basislinie; h = Gipfelhöhe;

b = Gipfelbreite auf halber Höhe

- b) Die Gipfel in Densitogrammen von gerade entfärbten Gelen (durchgezogene Linie) und von Gelen, die weitere 10 Stunden im Tageslicht standen (gestrichelte Linie) sind mit dem Planimeter ausgewertet. Die Symbole entsprechen denen im Teil a) dieser Abbildung.

- c) Die Gipfel in Densitogrammen gerade entfärbter Gele sind mit der Methode $h \cdot b$ ausgewertet. Die Symbole entsprechen denen in Teil a) dieser Abbildung.

natürlich kleine Substanzen aus dem Gel. Die Konzentration eines Pentanucleotids in einem 17.5 %igen Gel nimmt im Verlauf von 30 Stunden um 30 % ab (97).

Wenn die Färbebedingungen (Kapitel 5.4.7) genau eingehalten werden, läßt sich der Untergrund der Gele mit einer Tageslichtlampe in 10 - 20 Minuten entfärben. Wenn die Farbstoffkonzentration zu hoch gewesen ist, muß man länger belichten. Da der an Nucleinsäuren gebundene Farbstoff auch etwas lichtempfindlich ist, kommt es dann vor allem für schwache Banden zu einem merklichen Verblässen (Abb. 39b).

Da jedes Gel etwas anders gefärbt und entfärbt wird, ist es ratsam, nur die Pro-

ben eines Geles miteinander zu vergleichen, da die Gipfelflächen kein absolutes Maß für die eingesetzten A_{260} -Einheiten sind.

5. Experimenteller Teil

5.1 Spaltungen mit der Endonuclease aus Schafsniere

Das Gemisch aus tRNA und Nuclease wird im Standardpuffer aus 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1.5 mM $MgCl_2$ und 25 mM β -Mercaptoäthanol inkubiert.

5.1.1 Aliquots für die analytische Gelelektrophorese

Zu bestimmten Zeiten wird die Reaktion gestoppt, indem 0.01 ml oder 0.02 ml Aliquots mit einem gleichen oder größeren Volumen einer kalten Lösung von 0.004 % Bromphenolblau in 50 % Saccharose und 7 M Harnstoff vermischt werden. Die Proben lassen sich dann gut in die Taschen eines Geles pipettieren; sie können aber auch in dieser Form mehrere Monate in der Kühltruhe aufbewahrt werden.

5.1.2 Auswertung der Spaltkinetiken

In einer Serie von Densitogrammen werden die Flächen unter den Gipfeln bestimmt (Kap. 4.6) und gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Dabei ist die Fläche des tRNA-Gipfels im Densitogramm eines Aliquots zu Beginn der Reaktion 100 %. Die Summe der Flächen unter den Gipfeln der einzelnen Densitogramme sollte konstant sein, wenn nur anfärbbare Produkte entstehen, und sollte langsam abnehmen, wenn neben anfärbbaren Produkten auch Mono-, Di-, oder Trinucleotide entstehen.

5.1.3 Totalspaltung der Reaktionsprodukte mit T1-RNase

Zu bestimmten Zeiten werden 0.1 ml aus dem Inkubationsgemisch entnommen, zweimal mit Phenol und dreimal mit Äther extrahiert. Das Phenol und der Äther sind mit Standardpuffer gesättigt. Nach Verblasen des Äthers und Zugabe von 5 Einheiten T1-RNase zu 0.04 ml erfolgt in einer Stunde bei 45°C eine Totalspaltung der Reaktionsprodukte. Die quantitative Zusammensetzung der dabei entstehenden größeren

Oligonucleotide bestimmt man mit Hilfe der Gelelektrophorese. Dazu löst man in den Proben 10 mg Harnstoff und 10 mg Saccharose und pipettiert sie in die Taschen eines 16 %igen Geles. Bromphenolblau fehlt, da es ähnlich schnell wandert wie die Oligonucleotide und die Auswertung stören würde.

5.1.4 Quantitative Auswertung der Spaltungen mit T1-RNase

Nach der Auftrennung im 16 %igen Gel lassen sich die größeren Oligonucleotide (ab Tetranucleotid) anfärben. Bei der quantitativen Auswertung (Kap. 4.6) ist in jedem Densitogramm für die Fläche unter dem Gipfel des größten Oligonucleotids der Wert 1 anzunehmen. Die Flächen der anderen Gipfel sind darauf zu beziehen. Dies ist nötig, da die Konzentrationsänderungen beim Phenolisieren und Ausäthern variieren und die A_{260} -Einheiten in den einzelnen Proben verschieden sind.

5.1.5 Anilinspaltung der Reaktionsprodukte aus tRNA^{Phe}

0.01 ml der Aliquots, die für die Totalspaltung mit T1-RNase hergestellt wurden (Kap. 5.1.3), werden mit 0.01 ml 0.5 M Anilin, pH 2.3, 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Durch den Standardpuffer in den Aliquots resultiert dann ein pH von 3.0 - 3.5.

Anschließend werden 0.01 ml 0.1 M Tris-HCl, pH 8.3 und 0.02 ml einer Lösung von 0.004 % Bromphenolblau in 50 % Saccharose und 7 M Harnstoff hinzugegeben. Die Proben sind dann für die Gelelektrophorese präpariert.

5.1.6 Quantitative Auswertung der Anilinspaltungen

Das Prinzip ist in Kapitel 5.1.2 beschrieben.

5.2 Abbau mit Milz-PDE

Da die Milz-PDE als Ammoniumsulfatsuspension aufbewahrt wird, enthalten die

meisten Inkubationsansätze NH_4^+ -Ionen. Milz-PDE ohne NH_4^+ -Ionen erhält man direkt bei der Isolierung des Enzyms und durch Dialyse bei 4°C gegen destilliertes Wasser. Diese Fraktionen verlieren aber langsam an Aktivität und können nur etwa eine Woche bei 4°C aufbewahrt werden. Die Proben für die Gelelektrophorese erhält man genauso, wie es in Kapitel 5.1.1 beschrieben ist. Die Auswertung der Abbaukinetiken erfolgt nach demselben Prinzip wie in Kapitel 5.1.2.

5.3 Aktivitätstest der Nucleasen

Beide verwendeten Nucleasen werden getestet, indem das Entstehen säurelöslicher Nucleotide gemessen wird.

5.3.1 Test der SNN

Das Enzym wird genauso getestet, wie es in (13) beschrieben ist.

5.3.2 Test der Milz-PDE

Der Test wird etwas anders als in (44) durchgeführt. Das Substrat ist ein Gemisch aus Desoxyoligonucleotiden, das nach (122) hergestellt wird. Es ist zu beachten, daß etwa 30 % dieses Gemisches schon säurelöslich sind.

1.0 bis 1.5 A_{260} -Einheiten der Desoxyoligonucleotide werden in 0.1 ml 0.15 M Acetattuffer, pH 5.0, 0.01 M EDTA mit 0.005 ml der 1 : 10 verdünnten Ammoniumsulfatsuspension der Milz-PDE bei 37°C inkubiert. Nach 0, 0.5, 1, 2, 3 und 5 Minuten wird die Reaktion durch Zugabe von 0.9 ml 5 % TCA, 0.01 % Uranylacetat gestoppt. Nach 10 Minuten Stehen im Eisbad und 20 Minuten Zentrifugieren werden die Lösungen zum Temperatúrausgleich etwa 20 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen, da die anschließende UV-Absorption bei 260 nm temperaturabhängig ist.

Die Menge Enzym, die unter diesen Bedingungen den Anteil der säurelöslichen Nu-

cleotide um $0.2 A_{260}$ -Einheiten erhöht, entspricht einer Bernardi-Einheit (44).

5.4 Analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Das verwendete diskontinuierliche Puffersystem (pH 8.9) ist in (80) beschrieben.

5.4.1 Lösungen

Die folgenden Lösungen können mehrere Wochen im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Trenngelpuffer: 183 g Tris, 240 ml 1 M HCl (Titrisol), 1,15 ml TEMED,
mit H_2O ad 500 ml

Sammelgelpuffer: 3.7 g Tris, mit 7 M Harnstoff ad 500 ml, mit HCl pH 6.7
einstellen

20 % Cyanogum: 95 g Acrylamid, 5 g Bisacrylamid, mit 7 M Harnstoff
ad 500 ml

1 % TEMED: 1 ml konz. TEMED, mit 7 M Harnstoff ad 100 ml

Elektrodenpuffer: 55.3 g Diäthylbarbitursäure, 4.0 g Tris, mit H_2O ad 10 Liter

10 M Harnstoff: 1200 g Harnstoff mit H_2O ad 2000 ml, 20 g Kationenaustau-
scher (Bio-Rad AG 50W-X8), 20 g Anionenaustauscher (Bio-Rad
AG 2-X8), (bei Zimmertemperatur aufbewahren)

5.4.2 Trenngelsysteme

12 %: 20 g Acrylamid, 1.5 g Bisacrylamid, 104 ml 10 M Harnstoff,
20.5 ml Trenngelpuffer. Nach Auflösen, Filtrieren, Entgasen
und Zugabe von 100 mg Ammoniumpersulfat in 20.5 ml 7 M
Harnstoff polymerisiert das Gel in 15 - 30 Min.

- 16 %: 26 g Acrylamid, 2.15 g Bisacrylamid, 96 ml 10 M Harnstoff, 20.5 ml Trenngelpuffer. Nach Auflösen, Filtrieren, Entgasen und Zugabe von 110 mg Ammoniumpersulfat in 7 M Harnstoff polymerisiert das Gel in 15 - 30 Min.
- 17.5 % (18 %): 26 g Acrylamid, 2.15 g Bisacrylamid, 18 ml Trenngelpuffer mit 10 M Harnstoff ad 130 ml (126 ml). Nach Auflösen, Filtrieren, Entgasen und Zugabe von 100 mg Ammoniumpersulfat in 18 ml 7 M Harnstoff polymerisiert das Gel in 10 - 20 Min.
- 30 %: 50 g Acrylamid, 3.33 g Bisacrylamid, 90 ml 10 M Harnstoff, 21 ml Trenngelpuffer. Nach Auflösen, Filtrieren, Entgasen und Zugabe von 120 mg Ammoniumpersulfat in 4 ml 7 M Harnstoff polymerisiert das Gel in 5 - 10 Min.

5.4.3 Sammelgelsystem

10 ml 20 % Cyanogum, 5 ml Sammelgelpuffer, 2.5 ml 1 % TEMED, 20 ml 7 M Harnstoff. Nach Filtrieren, Entgasen und Zugabe von 30 mg Ammoniumpersulfat in 2.5 ml 7 M Harnstoff polymerisiert das Gel in 30 - 40 Min.

5.4.4 Herstellung des Geles

Die Kühlflächen der Elektrophoresekammer werden unter warmem Wasser gesäubert. Nachdem die Kammer zusammengesetzt ist, füllt man den Raum zwischen den beiden Kühlflächen mit der Trenngellösung. Eventuell dabei entstehende Luftblasen lassen sich durch Neigen der Kammer entfernen. Dann wird eine Plexiglasschablone (Trenngelschieber), die genauso dick ist wie der Abstand zwischen den Kühlplatten, 2 cm weit zwischen die beiden Kühlplatten gedrückt.

Wenn das Trenngel fest geworden ist, kann das Sammelgel gegossen werden. Vorher entfernt man mit einem Mikrospatel die Gelreste neben dem Trenngelschieber so weit, daß das Trenngel überall auf derselben Höhe beginnt, und zieht den Trenngelschieber

heraus. Eventuell zwischen den Kühlflächen zurückbleibende Gelpartikel lassen sich gut mit feuchtem Filterpapier entfernen, ohne daß die Trenngeloberfläche beschädigt wird. Direkt nachdem die Sammelgellösung auf das Trenngel gegossen ist, schiebt man den Probenkamm bis zum Anschlag zwischen die Kühlplatten. Insgesamt stehen 3 verschiedene Probenkämme zur Auswahl:

1. Kamm mit 16 1.0 cm breiten Zähnen für Proben mit $0.04 - 0.2 A_{260}$ -Einheiten in maximal 80 μ l.
2. Kamm mit 24 0.5 cm breiten Zähnen für Proben mit $0.02 - 0.1 A_{260}$ -Einheiten in maximal 40 μ l.
3. Kamm mit 40 0.2 cm breiten Zähnen für Proben mit $0.01-0.04 A_{260}$ -Einheiten in maximal 20 μ l.

Wenn pro Probe mehr als 5 Banden erwartet werden, ist die A_{260} -Menge entsprechend zu erhöhen, da einzelne Banden sonst zu schwach werden.

Nachdem das Sammelgel polymerisiert ist, wird das überstehende Gel entfernt und die Elektrophoresezelle bis zum Rand mit Elektrodenpuffer gefüllt. Beim vorsichtigen Lösen und Herausziehen des Probenkammes entstehen die Probentaschen.

5.4.5 Beschaffenheit der Proben

Die Proben enthalten 10 % - 20 % Saccharose, damit sie beim Auftragen mit einem zu einer Spitze ausgezogenen Polyäthylenschlauch bis zum Boden der Taschen sinken und sich nicht mit Elektrodenpuffer durchmischen. Der pH-Wert der Proben kann zwischen 8.0 und 3.5 schwanken. Auch der Salzgehalt der Proben ist für den Konzentrierungseffekt (106) bei genügend langem Sammelgel nicht kritisch. Mit 2 M NaCl tritt die Konzentrierung zwar verspätet ein und die Bande wird breiter als die Probentasche, die Trennung im Trenngel und die Schärfe der Banden wird aber nicht meßbar beeinträchtigt. Weiterhin enthalten die Proben als Marker den Farbstoff Bromphenolblau. Dieser sollte während der Elektrophorese mindestens 10 cm wandern. Eine längere Wanderungsstrecke bewirkt auch eine allgemein bessere Trennung (117).

5.4.6 Allgemeine Daten zur Elektrophorese

Die Elektrophorese dauert bei 300 - 400 V und 80 - 100 mA vier bis fünf Stunden. Wenn nicht anders angegeben, wird mit Eiswasser gekühlt. Eine Kühlung mit Leitungswasser (18°C) ist jedoch auch völlig ausreichend, da die Diffusion in den verwendeten Gelen vernachlässigbar klein ist. Selbst wenn während der Elektrophorese Wasser von 50°C durch die Kühlflächen fließt, ist die Schärfe der Banden nicht verändert. Sie hängt hauptsächlich von der Konzentration und dem Molekulargewicht der Nucleotidketten ab (117).

Während der Elektrophorese wird der Elektrodenpuffer ständig umgewälzt, um die pH-Änderungen im Anoden- und Kathodenraum auszugleichen.

5.4.7 Färben

Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel vorsichtig auf einer Kunststoffplatte aus der Elektrophorese genommen. Dabei spritzt man unter das Gel Wasser, damit es besser gleitet. Anschließend wird es etwa 30 Minuten lang gewässert und in ein Färbebad gelegt. Dazu löst man 20 - 25 mg Stains-All in 50 ml Dimethylformamid und verdünnt mit H₂O auf 1 Liter (121). Das Färbebad wird vor Licht geschützt und mit einer Wippe hin und her bewegt. Das Gel liegt auf einem V₂A-Drahtnetz, damit der Farbstoff von beiden Seiten eindiffundieren kann. Da der Farbstoff leicht ausfällt, müssen Wanne und Drahtnetz mit Alkohol gründlich gereinigt werden. Braune Flecken auf dem Gel, die dennoch entstehen, kann man vorsichtig mit Alkohol entfernen. 2.5 mm dicke 12 %ige Gele sind nach 16 - 20 Stunden vollständig durchfärbt. 3.3 mm dicke Gele bzw. höherprozentige Gele sollten 30 Stunden lang färben, wenn sie quantitativ ausgewertet werden sollen (Kap. 4.6).

Nucleinsäuren lassen sich ebenso gut mit anderen Farbstoffen anfärben (90, 120). Wir verwenden Stains-All, da dieser Farbstoff auch Oligonucleotide anfärbt (Kap. 4.4), und das Gel nach dem Färben sehr schnell entfärbt werden kann.

5.4.8 Entfärben

Der nicht an Nucleinsäuren gebundene violette Farbstoff ist außerordentlich lichtempfindlich und wird unter der Einwirkung einer Osram Vitalux-Lampe oder bei hellem Tageslicht schnell zu einem blaßgelben Produkt umgewandelt. Der an Nucleinsäuren gebundene Farbstoff ist aber auch etwas lichtempfindlich. Dies ist bei quantitativen Auswertungen zu beachten (Kap. 4.6).

5.4.9 Auswertung

Nachdem das Sammelgel mit einer Rasierklinge entfernt wurde, wird das Gel fotografiert und anschließend mit einem Schneideblatt eines Zwiebelchneiders in einzelne Streifen geschnitten. Diese säubert man unter fließendem Wasser und rollt sie naß gegen die Glasplatte des Densitometerschlittens. Gemessen wird bei 546 nm. Anfang und Ende des Gelstreifens geben sich im Densitogramm durch scharfe Zacken zu erkennen, die Banden als große oder kleine Gipfel. Es ist ratsam, jedes Densitogramm kurz mit dem entsprechenden Gelstreifen zu vergleichen, da Kratzer und Verunreinigungen Banden vortäuschen können, und manche Doppelbanden zwar im Gel aufgelöst sind, aber infolge der endlichen Spaltbreite des Densitometers nicht im Densitogramm.

Zur Bestimmung des R_B -Wertes einer Bande mißt man im Densitogramm die Entfernungen zwischen Gelanfang und Gipfelspitze der Bande bzw. Gipfelspitze des Bromphenolblaus und dividiert die Strecken durcheinander. Bei großen Konzentrationen sind die Gipfel nicht mehr symmetrisch, die Gipfelspitze täuscht eine etwas zu große Wanderungsstrecke vor (117). Dies ist zu berücksichtigen, wenn man von dem R_B -Wert mit Hilfe der Eichgeraden (Kap. 4.3) auf die Länge der entsprechenden Nucleotidkette schließt, die durch die Anzahl N der Nucleotide angegeben wird. Da weiterhin das elektrische Feld während der Elektrophorese nicht völlig homogen ist und Randproben etwas anders laufen und trotz der hohen Harnstoffkonzentration Reste von Sekundärstruktur vorhanden sein können (111), sind die Längenangaben auf Grund des R_B -Wertes nur gute Näherungswerte für die Anzahl N der Nucleotide. Im tRNA-Be-

reich gelten die Angaben mit ± 2 Nucleotiden, und im Bereich halber tRNA-Moleküle mit ± 1 Nucleotid. Die entsprechende Längenbestimmung für Oligonucleotide wird genauer im Kapitel 4.4 behandelt. Die Probleme einer quantitativen Auswertung sind im Kapitel 4.6 beschrieben.

5.4.10 Empfindlichkeit der Methode

Bei einer Differenz von 4-6 Nucleotiden sind auch große tRNA-Fragmente im 12 %igen Gel so weit voneinander getrennt, daß man im Densitogramm einen kleinen Gipfel von 10 mm^2 Fläche neben einem Gipfel von 2000-3000 mm^2 Fläche sehen kann. In einem Fragmentgemisch lassen sich demnach noch die Komponenten nachweisen, deren Konzentration nur 0.5 % von der des Hauptbestandteils ist.

5.5 Präparative Gelelektrophorese

5.5.1 Lösungen

Es werden dieselben Lösungen verwendet wie bei der analytischen Gelelektrophorese.

5.5.2 Trenngelsysteme

6 mm Gel: 36.6 g Acrylamid, 3.0 g Bisacrylamid, 192 ml 10 M Harnstoff,
36 ml Trenngelpuffer

1 cm Gel: 55 g Acrylamid, 4.5 g Bisacrylamid, 312 ml 10 M Harnstoff,
60 ml Trenngelpuffer

Nach Auflösen, Filtrieren, Entgasen und Zugabe von 230 mg bzw. 330 mg Ammoniumsulfat in 70 ml 7 M Harnstoff polymerisiert das Gel in 15-30 Minuten.

Die Acrylamidkonzentration in diesen Trenngelsystemen ist 12 % bzw. 11 %. Die Bisacrylamid-Konzentration ist so hoch wie im analytischen Gel. Mit der halben

Bis-Konzentration sind die Trennungen ebenso gut; die Elution (Kap. 5.5.8) ist dann vielleicht auf Grund der größeren Poren begünstigt.

5.5.3 Sammelgelsystem

6 mm Gel: 15 ml 20 % Cyanogum, 7.5 ml Sammelgelpuffer, 5 ml 1 % TEMED,
30 ml 7 M Harnstoff

1 cm Gel: 30 ml 20 % Cyanogum, 15 ml Sammelgelpuffer, 7.5 ml 1 % TEMED,
60 ml 7 M Harnstoff

Nach Filtrieren, Entgasen und Zugabe von 70 mg bzw. 105 mg Ammoniumpersulfat in 5 ml bzw. 7.5 ml 7 M Harnstoff polymerisiert das Gel in 30 bis 40 Min.

5.5.4 Herstellung des Geles

Hierfür gilt durchweg das in Kapitel 5.4.4 Gesagte, nur die Probenkämme sind natürlich anders.

1. Kamm mit 3 6 cm breiten und 4 mm dicken Zähnen für das 6 mm Gel. Pro Tasche 15 bis 50 A_{260} -Einheiten in maximal 0.4 ml.
2. Kamm mit 3 6 cm breiten und 8 mm dicken Zähnen für das 1 cm Gel. Pro Tasche 30 bis 100 A_{260} -Einheiten in maximal 0.8 ml.

Die angegebenen oberen Grenzen für die A_{260} -Einheiten sollte man nur nehmen, wenn die Banden bei einem Test im analytischen Gel weit voneinander entfernt sind. Wenn die R_B -Werte von Fragmenten, die im präparativen Gel getrennt werden sollen, sich nur um 10 % unterscheiden, gelten die unteren Grenzen.

Die Beladung des Gels pro mm^2 ist im präparativen Gel größer als im analytischen Gel. Die Trennungen sind aber genauso gut oder sogar besser, da die Wanderungsstrecken größer sind (Kap. 5.5.6).

5.5.5 Beschaffenheit der Proben

In 0.5 ml der Fragmentlösungen löst man 150 mg Saccharose, 250 mg Harnstoff und 0.2 mg Bromphenolblau. Mit einer 100 μ l Pipette werden dann die Proben vorsichtig auf dem Boden der Sammelgeltaschen aufgetragen.

5.5.6 Allgemeine Daten

Die Elektrophorese dauert bei 60-80 V und 60-80 mA etwa 20 Stunden. Während dieser Zeit würde das Bromphenolblau etwa 20 cm wandern, doppelt so weit als im analytischen Gel. Dadurch wird die Trennung verbessert (117). Zur Vermeidung eines großen Temperaturgradienten zwischen der Gelmitte und den Kühlflächen wird nicht mit Eiswasser, sondern mit Leitungswasser gekühlt. Aus demselben Grund sind die Werte für Spannung und Stromstärke geringer als bei einem analytischen Gel.

5.5.7 Färben

Das Gel wird in etwa 1 cm breite Streifen geschnitten, die 1 bis 2 Stunden in einer 0.01 %igen wässrigen Lösung von Toluidinblau (90) angefärbt werden.

5.5.8 Isolierung

Die elektrophoretische Beweglichkeit ist auf Grund des stets vorhandenen Temperaturgradienten in der Gelmitte etwas größer als an den Geloberflächen. Im Gelquerschnitt sind die Banden also mehr oder weniger gebogen. Mit einem entsprechend geformten scharfen Spatel werden die gefärbten Zonen in den einzelnen Streifen ausgestochen, gesammelt und mit einem Homogenisator zerkleinert. Zur Isolierung der Fragmente rührt man die Gelpartikel 2 bis 3 Tage in einer kalten Lösung aus 30 ml Phenol und 100 ml H_2O . Anschließend läßt man die Lösungen 2 Stunden bei Zimmertemperatur stehen, hebt die wässrige Phase ab und extrahiert sie mit Äther. Die weitere Reinigung geschieht mit einer DEAE-Cellulose-Säule (1 cm $\cdot$ 10 cm). Dabei werden die kleinen Mengen Toluidinblau der wässrigen Phase nicht an die Cellulose

gebunden, und die vorhandenen sehr feinen Gelpartikel wandern nicht durch die Säule. Das Fragment eluiert man mit einem linearen Gradienten (200 ml 0.01 bis 0.8 M NaCl in 10 M Tris-HCl, pH 7.5, und 7 M Harnstoff). Anschließend wird es nach Dialyse (24 Stunden gegen H_2O) und Einengen im Rotationsverdampfer im analytischen Gel auf seine Reinheit getestet.

5.5.9 Ausbeuten

Die Elution der Fragmente ist abhängig von der Gelpartikelgröße und vom Konzentrationsgefälle zwischen Gel und umgebender Lösung. Im allgemeinen liegen die Ausbeuten bei 50 %. Sie werden durch Zugabe von 1 % NaCl und 0.1 % $MgCl_2$ nicht wesentlich erhöht.

Versuche, die Nucleotidketten in einem elektrischen Feld aus den Gelpartikeln wandern zu lassen und an DEAE-Cellulose-Papier zu adsorbieren, führten zu keinem brauchbaren Ergebnis.

5.6 Präparative Spaltungen mit Milz-PDE

Die Bedingungen werden durch analytische Testspaltungen ermittelt.

Die Reaktion wird durch Zugabe von Phenol (10 % des Inkubationsvolumens) und kurzes Erhitzen auf $80^{\circ}C$ gestoppt. Nach Abzentrifugieren des denaturierten Proteins, Dialyse gegen H_2O und Einengen im Rotationsverdampfer werden die Proben, wie in Kapitel 5.5.5 beschrieben, präpariert.

5.7 Abspaltung des 5'-terminalen Phosphats

Das 5'-terminale Phosphat wird durch alkalische Phosphatase aus E. coli (PME) gespalten (123).

4 bis 400 A_{260} -Einheiten tRNA, tRNA-Fragment oder 5 S RNA werden mit 0.03 bis 3 Einheiten PME in 0.04 bis 4.0 ml 0.1 M Tris-HCl, pH 8.3, 30 Minuten bei 60°C inkubiert. Das Protein wird durch Phenol extrahiert. Die dephosphorylierten tRNAs und Fragmente werden in Konzentrationen von 5 bis 50 A_{260} -Einheiten pro ml bei 4°C der Reihe nach gegen 1 M NaCl, 5 mM EDTA, pH 7.0 (10 - 15 Stunden), 5 mM EDTA, pH 7.0 (10 - 15 Stunden) und destilliertes Wasser (15 - 20 Stunden) dialysiert (124).

5.8 Einbau von Aminosäuren in tRNA und Fragmentkombinationen

5.8.1 Im Inkubationsgemisch

Im Verlauf des Abbaus mit SNN oder Milz-PDE wird zu bestimmten Zeiten in Aliquots die Nuclease durch Phenol inaktiviert und extrahiert. Nach Ausäthern der wässrigen Phase wird die Akzeptoraktivität der verschiedenen tRNAs für Aminosäuren wie in (125) bestimmt.

5.8.2 In Kombinationen isolierter und gereinigter Fragmente

0.018 bis 0.033 A_{260} -Einheiten CCA-Fragment werden bis zum 14-fachen Überschuß mit pG-Fragment in 0.08 ml 90 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$, 6 mM Cacodylat, pH 7.0, wenn nicht anders angegeben, bei 37°C 15 Minuten vorinkubiert. Nach Zugabe von 5 nM ^{14}C -Phe oder ^{14}C -Ser, 1 μ Mol ATP, 1.5 μ Mol $MgCl_2$, 2.5 μ Mol Tris-HCl, pH 7.5, 100 μ Einheiten Phe- bzw. 70 μ Einheiten Ser-tRNA-Synthetase (126) und 20 μ Einheiten CCA-Nucleotidyltransferase (58) bei den tRNA^{Phe}-Fragmenten in 0.02 ml wird das Gesamtgemisch bei den angegebenen Temperaturen inkubiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgt genauso, wie es in (125) beschrieben ist.

5.9 Analyse von tRNA-Fragmenten

Die isolierten tRNA-Fragmente werden durch T1-RNase in Gp und Oligonucleotide gespalten. Diese Oligonucleotide werden durch Säulenchromatographie und Papieroelektrophorese voneinander getrennt, identifiziert und quantitativ bestimmt.

5.9.1 Totalspaltung durch T1-RNase

8-45 A₂₆₀-Einheiten tRNA-Fragment in 2 ml werden mit 100 Einheiten T1-RNase bei 45°C und pH 7.5 etwa drei Stunden inkubiert. Die bei der Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen freigesetzte Säure wird durch 0.01 nNaOH neutralisiert. Die Laugenzugabe steuert dabei ein Autotitrator.

Nach Zugabe von 1 g Harnstoff werden die Oligonucleotide an DEAE-Cellulose chromatographiert.

5.9.2 Säulenchromatographie von Oligonucleotiden

Die Säulenmaße für die Analyse von tRNA^{Phe}-Fragmenten und tRNA^{Ser}-Fragmenten sind 0.3 · 75 cm bzw. 0.3 · 100 cm; 500 ml linearer Gradient 0 bis 0.3 M NaCl in 7 M Harnstoff, 10 mM Tris HCl, pH 7.5 (74); Fraktionsvolumen 0.9 bis 1.0 ml; Flußgeschwindigkeit 2 bis 7 ml pro Stunde bei 22°C und einem Druck von etwa 1.5 atü. Damit die Säulen unter diesem Druck nicht verstopfen, müssen die feinen Cellulosepartikel durch mehrmaliges Schlämmen im Ausgangspuffer entfornt werden.

5.9.3 Isolierung von Oligonucleotiden nach Säulenchromatographie (127)

Die Oligonucleotide werden als Zinksalz zusammen mit basischem Zinkacetat gefüllt und gewaschen. Die Zinksalze löst man dann als Amminkomplex in 1 M Ammoniumcarbonat. Bei Zugabe eines Kationenaustauschers (Bio-Rad AG 50W-X8, H⁺-Form) werden die Zink- und Ammoniumionen gebunden und die Anionen (Oligonucleotide) anschließend vom Austauscher abfiltriert. Sehr genau ist diese Methode in (74) be-

schrieben.

5.9.4 Charakterisierung von Oligonucleotiden

Kleinere Oligonucleotide werden nach einer Papierelektrophorese bei pH 2.7 durch das Verhältnis ihrer Laufstrecke zu der des UMP (R_{Up} -Wert) und ihre Absorptionsspektren charakterisiert. Dabei mißt man die Absorption zwischen 225 nm und 320 nm in Wasser und in 0.02 N Salzsäure.

Größere Oligonucleotide werden, wenn erforderlich, durch Pankreas-RNase weiter gespalten oder durch Behandlung mit PME und Schlangengift-PDE (PME/PDE) bzw. Schlangengift-PDE alleine (PDE) zu Nucleosiden bzw. Nucleotiden abgebaut (9). Die Produkte der Spaltung mit Pankreas-RNase trennt man mit Hilfe der Papierelektrophorese. Die Nucleoside und Nucleotide werden mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie auf DEAE-Cellulose-Platten getrennt, identifiziert und bestimmt. Die Trennung erfolgt mit drei Systemen.

- A: 160 ml Ammoniumsulfat (gesättigt), 36 ml 1 M Na-Acetat, pH 5.5,
4 ml Isopropanol
- B: 228 ml Isopropanol, 58 ml Konz. HCl
- C: 65 ml n-Butanol, 15 ml Methanol, 5 ml Konz. NH_3 , 20 ml H_2O

5.10 Radioaktivitätsmessungen

Die 1 mm oder 2 mm breiten Gelschnipsel werden über Nacht in 0.5 ml 1 N Ammoniak eingeweicht. Nach Trocknen im Vakuumexikator und Zugabe von 5 ml Bray-Szintillator (115) werden die Proben in einem Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

5.11 Materialien

5.11.1 tRNA, tRNA-Fragmente und Oligonucleotide

tRNA^{Ser}_{I, II} (Akzeptoraktivität 1.0 - 1.2 nMol Ser/A₂₆₀-Einheit) und tRNA^{Phe} (Akzeptoraktivität 1.1 - 1.3 nMol Phe/A₂₆₀-Einheit) aus Brauereihefe und tRNA^{Ser}_{II} aus Bäckerhefe wurden von S. Notz und H.G. Zachau nach (9 bzw. 29) isoliert. tRNA^{Tyr} (Akzeptoraktivität 1.3 nMol Tyr/A₂₆₀-Einheit) wurde aus Brauereihefe nach (128) von T. Igo-Kemenes dargestellt. Eine angereicherte Fraktion tRNA^{Val}_{Hefe} war ein Geschenk von H. Feldmann. tRNA^{Phe}_{Weizen} (75) wurde von R. Thiebe und tRNA^{Phe}_{Hefe} (HCl) von K. Harbers zur Verfügung gestellt. 1 A₂₆₀-Einheit tRNA ist diejenige Menge an tRNA, die in 1 ml gelöst bei 260 nm, pH 7 und 1 cm Lichtweg die Extinktion 1 hat. 1 A₂₆₀-Einheit tRNA^{Phe} (76 Nucleotide) entspricht 1.65 nMol tRNA^{Phe}. 5 S RNA aus E.coli war ein Geschenk von R. Monier, Marseille. Die Fragmente Phe 1-36, Phe 38-76 und Phe 1-18 stellten K. Harbers und die Fragmente Ser 1-34 und Ser 36-85 F. Fittler zur Verfügung. Die verschiedenen Oligonucleotide wurden durch Spaltung von tRNA^{Phe}, tRNA^{Ser} und tRNA^{Tyr} mit T1- oder Pankreas-RNase dargestellt und stammen von J. Kruppa, T. Igo-Kemenes, R.-E. Streeck, W. Wintermeyer, M. Petrova und S. Notz.

5.11.2 Enzyme

Die Endonuclease aus Schafsnieren (SNN) wurde nach (13) dargestellt. Die durch Druckdialyse konzentrierten und mit 20 % Glycerin versetzten Fraktionen behalten bei -10°C über ein Jahr lang ihre volle Aktivität. (500 Einheiten/ml). Die Milz-PDE wurde nach (44) dargestellt, und zwar bis zum Reinigungsschritt über eine Sephadex G-75-Säule. Die durch Druckdialyse konzentrierten und in 80 % Ammoniumsulfat aufbewahrten Fraktionen behalten bei +4°C über ein Jahr lang ihre volle Aktivität. (400 Einheiten/mg Protein). Das unfractionierte Gemisch der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (E. C. 6.1.1) wurde von R. Hirsch aus Brauereihefe-Extrakt durch Ammoniumsulfat-Fraktionierung (45-67 % Sättigung) isoliert. 200 - bis 300-fach angereicherte

Seryl- bzw. Phenylalanyl-tRNA-Synthetase wurden ebenfalls von R. Hirsch zur Verfügung gestellt.

Die Anreicherung sowie die Definition der Einheiten sind in (126) beschrieben. tRNA-Nucleotidyl-Transferase (EC 2.7.7.25) wurde von H. Overath aus Brauereihefe-Extrakt etwa 125-fach angereichert. Die Reinigungsschritte und die Definition der Einheiten sind in (58) beschrieben. T1-Ribonuclease (T1-RNase) (EC 3.1.4.8) war ein Produkt der Fa. Sankyo u. Co, Tokio, mit 5000 Einheiten/ml (129). Pankreas-Ribonuclease (Pankreas-RNase) (EC 2.7.7.16) wurde von Boehringer Mannheim GmbH bezogen. Die Aktivität (130) war mit 40 Einheiten/mg Protein angegeben. Alkalische Phosphatase (PME) aus E. Coli (EC 3.1.3.1) wurde als Rohprodukt von Worthington Biochemical Corp., Freehold, N. J., bezogen und nach einer bekannten Vorschrift (131) gereinigt. Phosphodiesterase aus Schlangengift (PDE) (EC 3.1.4.1) wurde von H. Feldmann nach (132) aus dem Gift von Crotalus adamanteus (R. Allens's Reptile Institute, Silver Spring, Flo.) isoliert.

5.11.3 Materialien für die Chromatographie

DEAE-Cellulose (Serva Entwicklungslabor, Heidelberg) wurde nach dem Quellen in Wasser in 0.5 N NaOH eingerührt (20 Min.; starkes Rühren wurde vermieden), neutral gewaschen, mit 1 M NaCl behandelt, bis zur Neutralität mit 1 M NaCl gewaschen und im gewünschten Puffer geschlämmt. BD-Cellulose (benzoylierte DEAE-Cellulose) wurde von J. Kruppa nach (116) hergestellt. Sie wurde vor Gebrauch mit 1 M NaCl, dann mit 1 M NaCl + 20 % Äthanol und zuletzt mit dem gewünschten Puffer gewaschen. CM-Sephadex C-50, Sephadex G-75 und Sephadex G-100 waren Produkte der Fa. Pharmacia, Uppsala und wurden nach der angegebenen Vorschrift behandelt. Für die Dünnschichtchromatographie wurden Cellulose-Platten mit und ohne Fluoreszenzindikator der Fa. Merck, Darmstadt, verwendet.

5.11.4 Chemikalien und sonstige Materialien

Alle Reagenzien stammen, wenn nicht anders angegeben, von der Fa. Merck, Darm-

stadt. Die Chemikalien für die Gelelektrophorese wie Acrylamid (AA), NN'-Methylen-bisacrylamid (Bisacrylamid oder Bis), Tetramethyläthylendiamin (TEMED), Diäthyl-barbitursäure, Bromphenolblau und Toluidinblau wurden von der Fa. Serva, Entwicklungs-labor, Heidelberg, bezogen. Der Trimethinfarbstoff 1-Äthyl-2-(3-(1-Äthylnaphto (1. 2d) Thiazolin-2-Yliden)-2-Methylpropenyl) -Naphtho (1. 2d) Thiazolium Bromid (Stains-all) zum Anfärben von tRNA und Oligonucleotiden in Gel stammte von der Fa. Eastman Organic Chemicals, Rochester, N. Y., USA. ^{14}C -Aminosäuren und ^{32}P -ATP wurden von The Radiochemical Centre, Amersham, England bezogen. ^3H -NaBH₄ (200 C/M stammte von der New England Nuclear Corp., Boston, Mass., USA. Der Toluolszintillator enthielt 4 g Omnifluor (New England Nuclear Corp., Boston, Mass.) in 1 l über Natrium destilliertem Toluol. Bray-Szintillator (115) enthielt in einem Liter 60 g Naphthalin, 4 g Omnifluor, 100 ml Methanol (abs.), 20 g Glycol (dest.) und Dioxan. Für die Papierelektrophorese wurde das Papier 2043 b Mgl. der Fa. Schleicher u. Schüll, Einbeck, benutzt.

5. 11. 5 Apparative Hilfsmittel

Für die Gelelektrophorese wurde die Elektrophoresekammer EC 490 der Fa. E-C Apparatus Corp., Philadelphia, USA, benutzt (Abstand der Kühlplatten 3.1 - 3.3 mm), oder eine von Herrn Schick und Herrn Mann in unserer Werkstatt gebaute Zelle, die die Vorteile des E-C-Gerätes enthält, und bei der die plangeschliffenen Kühlplatten durch Einschrauben entsprechender Schablonen 2.5, 6, 10 und 20 mm Abstand von-einander haben können. Für die densitometrische Auswertung von Gelen wurde in das Filterphotometer PL 4 der Fa. Zeiss, Oberkochen, von Herrn Hackenspiel in unserer Werkstatt ein Schlitten eingebaut, der mit konstantem Vorschub am Spalt vorbeiläuft. Zum Zerkleinern der Gele wurde der Ultraturrax TP 18/2 der Fa. Janke und Kunkel, Staufen i. Br., benutzt. Zur Messung der UV-Absorption wurde entwe-der ein Spektralphotometer PMQ II der Fa. Zeiss, Oberkochen, oder ein registrie-rendes Spektralphotometer, Cary Modell 15, Varian Ass., benutzt. Radioaktivitäts-messungen wurden mit einem Flüssigkeits-Szintillationszähler (Packard Instrument Inc., La Grange, Ill., Tricarb-Modell 3310 oder 3375) vorgenommen. Zur Konstant-haltung des pH-Wertes bei Nuclease-Spaltungen wurde ein Autotitrator der Fa. Ra-diometer, Kopenhagen, benutzt. Das Gerät zur Druckdialyse stammte von Amicon, Den Haag.

6. Zusammenfassung der Ergebnisse

Der Abbau mehrerer tRNAs und tRNA-Fragmente mit einer Endonuclease aus Schafsnieren (SNN) und einer Exonuclease aus Schweinemilz (Milz-PDE) wurde untersucht. Für die speziellen Probleme, tRNA-Fragmente sowie Oligonucleotide zu trennen und ihre Konzentrationsänderungen im Verlauf der Spaltungen zu bestimmen, wurde die Methode der Elektrophorese in Polyacrylamidgelen modifiziert.

Die SNN war durch Versuche mit synthetischen Polynucleotiden als einzelstrangspezifische Nuclease charakterisiert worden. Versuche mit tRNA^{Phe} aus Hefe zeigten, daß dieses Substrat nur im CCA-Teil des doppelsträngigen Akzeptorstammes gespalten wird. Dabei entsteht das Fragment Phe 1-69/70. Quantitative Auswertungen von Spaltungskinetiken und Akzeptoraktivitätstests für Aminosäuren ließen erkennen, daß bei analogen Versuchen mit tRNA^{Phe} (HCl), tRNA^{Tyr}, tRNA^{Ser} und tRNA^{Val} aus Hefe sowie tRNA^{Phe} aus Weizen die Spaltung durch SNN hauptsächlich oder ausschließlich im Akzeptorstamm erfolgt. Eine mögliche Deutung für diese unerwarteten Ergebnisse war, daß der Akzeptorstamm zwar doppelsträngig aber relativ exponiert ist und darum angegriffen wird.

Die Milz-PDE baut native und dephosphorylierte tRNA^{Phe}, tRNA^{Ser}, tRNA^{Tyr} und tRNA^{Val} aus Hefe vom 5'-Ende her ab. Die quantitative Auswertung der Abbaukinetiken zeigte, daß an einigen Stellen, sogenannten Stopstellen, der Weiterabbau so verlangsamt ist, daß die entsprechenden Fragmente in sehr viel größeren Konzentrationen auftreten als die anderen Zwischenstufen. Alle Bereiche zwischen diesen Stopstellen werden asynchron abgebaut, das heißt, daß die Milz-PDE praktisch nur an den Stopstellen vom Substrat abdissoziiert. Infolge dieser Unterbrechungen wird der Gesamtabbau synchronisiert. Durch die Analyse einiger, mit Hilfe der präparativen Gelelektrophorese isolierter Fragmente und durch Vergleich der Abbaukinetiken von NaBH₄ behandelter und unbehandelter tRNA^{Tyr}, tRNA^{Ser} und tRNA^{Val} konnte gezeigt werden, daß sowohl der Anfang von Doppelsträngen als auch Dihydrouridin und Ureidopropanolribosid Stopstellen bedingen. Weiterhin gibt es mehrere Hinweise da-

rauf, daß es auch am Nucleosid Pseudouridin zu einer Dissoziation des Nuclease-Nucleinsäure-Komplexes kommt. Sequenz und Sekundärstruktur einer Nucleinsäure beeinflussen demnach ihre Wechselwirkungen mit der Milz-PDE. Die 5 S RNA aus *E. coli* enthält keine seltenen Nucleotide. Die beim Abbau dieser RNA beobachteten Stopstellen entstehen darum wahrscheinlich durch den Anfang von Doppelsträngen. Einen Hinweis auf den Einfluß der Tertiärstruktur gab eine Stopstelle im Akzeptorstamm der tRNA^{Phe}. Diese Unterbrechung des Abbaus konnte damit erklärt werden, daß der Akzeptorstamm, wie zwei Tertiärstrukturmodelle vorschlagen, in die hU-Schleife gefädelt ist.

Weiterhin wurde gezeigt, daß tRNAs bei Anwesenheit von Mg^{++} -Ionen (1 Mol pro Mol Nucleotid) nicht mehr abgebaut werden, daß bei Anwesenheit von Ammoniumionen (20 - 100 mM) einige Fragmente in größerer Konzentration auftreten und daß bei Erhöhung der Temperatur (bis 70°C) sowie Erniedrigung des pH-Wertes (bis 2.9) die Zahl der Stopstellen steigt. Ferner konnte die Komplexbildung komplementärer Hälften der tRNA^{Phe} und tRNA^{Ser} dadurch nachgewiesen werden, daß die Primärsplattung an den 5'-Enden dieser Fragmente infolge der Ausbildung von Doppelsträngen verlangsamt ist.

Die durch Partialsplattungen mit Milz-PDE erhaltenen Fragmente Phe 10/11-76, Phe 16?-76, Phe 27-76, Ser 9/11-85, Ser 16?-85 und Ser 44-85 wurden allein und nach Kombination mit anderen Fragmenten auf ihre Beladbarkeit mit Phenylalanin bzw. Serin getestet. Danach sind die ersten beiden Basenpaare im Akzeptorstamm sowie Teile des Anticodonstammes und die Anticodonschleife für eine Aminoacylierung der tRNA^{Ser} nicht notwendig. Es gibt sogar Hinweise darauf, daß die pG-Hälfte des Akzeptorstammes der tRNA^{Ser} kein essentieller Bestandteil der Synthetase-Erkennungsregion ist und hauptsächlich zur Stabilisierung des CCA-Endes dient. Weiterhin können Fragmentkombinationen, die bis zu 30 % der Sequenz der tRNA^{Phe} bzw. tRNA^{Ser} doppelt enthalten, ohne merkliche Störung beladen werden.

Die Elektrophorese in Polyacrylamidgel wurde so durchgeführt, daß bis zu 40 Proben nebeneinander auf einer Gelplatte getrennt werden konnten. Die für bestimmte

Molekulargewichtsbereiche und entsprechende Gelsysteme bekannte lineare Beziehung zwischen der Beweglichkeit einer Nucleinsäure und dem Logarithmus ihres Molekulargewichts wurde für tRNAs und tRNA-Fragmente in 12 % - 18 %igen Gelen im einzelnen ausgearbeitet. Die damit erhaltenen Eichgeraden dienen zur Abschätzung der Kettenlänge unbekannter Fragmente. Weiterhin wurde das Trennverhalten vieler Olinucleotide untersucht. Versuche mit bekannten Mengen verschiedener Polynucleotide zeigten, daß das Lambert-Beer'sche Gesetz für die verwendeten Konzentrationen gültig ist. Dabei war die Fläche unter den Gipfeln in Densitogrammen ein Maß für die Extinktion der Banden. Der Abbau der tRNAs und tRNA-Fragmente konnte somit auch quantitativ verfolgt werden.

7. Literaturverzeichnis

- (1) Transcription of Genetic Material, Cold Spring Harbor Symp. Quantit. Biol., 35 (1970)
- (2) The Mechanism of Protein Synthesis, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34 (1969)
- (3) Factors Affecting Gene Expression, Methods in Enzymologie, 21 (1971) 483
- (4) M. Yarus, Annu. Rev. Biochem., 38 (1969) 841
- (5) H.G. Zachau, Angew. Chemie, 81 (1969) 645 und Internat. Ed. 8 (1969) 711
- (6) F. Cramer, Progr. Nucl. Acid Res. and Mol. Biology, 11 (1971) 391
- (7) S. Arnott, Progr. in Biophysics and Molecular Biology, 22 (1971) 181
- (8) W. Fuller, S. Arnott und J. Creek, Biochem. J., 114 (1969) 26 P
- (9) H.G. Zachau, D. Dütting und H. Feldmann, Z. Physiol. Chem. 347 (1966) 212
- (10) H. Witzel, Progr. Nucl. Acid. Res., 2 (1963) 221
- (11) F. Egami und K. Nakamura, Microbial Ribonucleases, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, (1969) S. 25-33
- (12) E.A. Barnard, Ann. Rev. Biochem., 38 (1969) 677
- (13) K. Kasai und M. Grunberg-Manago, Europ. J. Biochem., 1 (1967) 152
- (14) S. Linn und L.R. Lehman, J. Biol. Chem., 240 (1965) 1287, 1294
- (15) W.E. Razzell und H.G. Khorana, J. Biol. Chem., 236 (1961) 1144
- (16) W.E. Razzell und H.G. Khorana, J. Biol. Chem., 234 (1959) 2105
- (17) L.R. Lehman, Progr. Nucl. Acid. Res., 2 (1963) 83
- (18) R.B. Loftfield, L.I. Hecht und E.A. Eigner, Biochim. Biophys. Acta, 72 (1963) 383
- (19) T. Ishida, J.L. Arceneaux und N. Sueoka, Methods in Enzymologie, 20 (1971) 98

- (20) R. -E. Streeck, Dissertation, München (1971)
- (21) K.B. Jacobson, Progr. Nucl. Acid Res. and Mol. Biology, 11 (1971) 461
- (22) T. Igo-Kemenes und H.G. Zachau, Europ. J. Bioch., 10 (1969) 549
- (23) N.K. Kochetkov und E.I. Budowsky, Progr. Nucl. Acid Res. and Mol. Biology, 9 (1969) 403
- (24) A.D. Mirzabekov, L.Y. Kazarinova, D. Lastity und A.A. Bayev, FEBS Letters, 3 (1969) 268
- (25) T. Seno, I. Kobayashi, M. Fukuhara und S. Nishimura, FEBS Letters, 7 (1970) 343
- (26) N. Imura, G.B. Weiss und R.W. Chambers, Nature, 222 (1969) 1147
- (27) P. Philippsen und H.G. Zachau, FEBS Letters, 15 (1971) 69
- (28) R. Thiebe, K. Harbers und H.G. Zachau, Manuskript in Vorbereitung
- (29) P. Philippsen, R. Thiebe, W. Wintermeyer und H. G. Zachau, Biochem. Biophys. Res. Commun., 33 (1968) 922
- (30) U.L. RajBhandary und S.H. Chang, J. Biol. Chem., 243 (1968) 598
- (31) U.L. RajBhandary, A. Stuart und S.H. Chang, J. Biol. Chem., 243 (1968) 584
- (32) J.T. Madison, G.A. Everett und H.G. Kung, Science, 153 (1966) 531
- (33) A.A. Bayev, T.V. Venkstern, A.D. Mirzabekov, A.I. Krutilina, L. Li und V.D. Axelrod, Mol. Biol. (USSR), 1 (1967) 754
- (34) B.S. Dudock, G. Katz, E.K. Taylor und R.W. Holley, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 62 (1969) 941
- (35) A.A. Bayev, I. Fodor, A.D. Mirzabekov, V.D. Axelrod und L.Y. Kazarinova, Mol. Biol. (USSR), 1 (1967) 859
- (36) T. Seno, K. Sano und T. Katsura, FEBS Letters, 12 (1971) 137
- (37) R. Monier, 7. FEBS-Meeting, Varna (1971)
- (38) B.R. Jordan, J. Mol. Biol., 55 (1971) 423
- (39) R. Thiebe und H.G. Zachau, Europ. J. Bioch., 5 (1968) 546

- (40) L.A. Heppel und R. J. Hilmo, Federation Proc., 12 (1953) 217
- (41) L.A. Heppel und R. J. Hilmo, Methods in Enzymologie, Vol. 2 (1955) 565
- (42) R. J. Hilmo, J. Biol. Chem., 235 (1960) 2117
- (43) L.A. Heppel und P. R. Whitfeld, Biochem. J., 60 (1955) 1
- (44) A. Bernardi und G. Bernardi, Biochim. Biophys. Acta, 155 (1968) 360
- (45) A. Bernardi und G. L. Cantoni, J. Biol. Chem., 244 (1969) 1468
- (46) M. Petrova, P. Philippsen und H. G. Zachau, Manuskript in Vorbereitung
- (47) P. Cerutti und N. Miller, J. Mol. Biol., 26 (1967) 55
- (48) G. G. Brownlee, F. Sanger und B. G. Barrell, Nature, 215 (1967) 735
- (49) Handbook of Biochemistry, The Chemical Rubber Co, (1968) Seite C 10
- (50) K. Harbers, persönliche Mitteilung
- (51) M. Molinaro, L. B. Sheiner, F. A. Neelon und G. L. Cantoni, J. Biol. Chem., 243 (1968) 1277
- (52) R. Thiebe, persönliche Mitteilung
- (53) J. Kruppa, Dissertation München (1971)
- (54) T. Seno, M. Kobayashi und S. Nishimura, Biochim. Biophys. Acta, 182 (1969) 280
- (55) N. Imura, H. Schwam und R. W. Chambers, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 62 (1969) 1203
- (56) W. Wintermeyer, R. Thiebe, H. G. Zachau, D. Riesner, R. Römer und G. Maass, FEBS Letters, 5 (1969) 23
- (57) R. Römer, D. Riesner, G. Maass, W. Wintermeyer, R. Thiebe und H. G. Zachau, FEBS Letters, 5 (1969) 15
- (58) H. Overath, F. Fittler, K. Harbers, R. Thiebe und H. G. Zachau, FEBS Letters, 11 (1970) 289
- (59) N. G. Nossal und M. F. Singer, J. Biol. Chem., 243 (1968) 913
- (60) H. M. Lazarus und M. P. Sporn, Proc. Nat. Acad. Sc. U. S., 57 (1967) 1386

- (61) C.B. Klee und M.F. Singer, J. Biol. Chem., 243 (1968) 923
- (62) M.N. Thang, W. Guschlbauer, H.G. Zachau und M. Grunberg-Manago, J. Mol. Biol., 26 (1967) 403
- (63) O.C. Uhlenbeck, J. Baller und P. Doty, Nature, 225 (1970) 508
- (64) O. Pongs, E. Reinwald und K. Stamp, FEBS Letters, 16 (1971) 275
- (65) W. Wintermeyer und H.G. Zachau, FEBS Letters, 11 (1970) 160
- (66) L.H. Schulman und R.W. Chambers, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 61 (1968) 308
- (67) A.D. Mirzabekov, D. Lastity, E.S. Levina und A.A. Bayev, Nature New Biol., 229 (1971) 21
- (68) M. Staehelin, H. Rogg, B.C. Baguley, T. Ginsberg und W. Wehrli, Nature, 219 (1968) 1363
- (69) H. Ishikura, Y. Yamata und S. Nishimura, FEBS Letters, 16 (1971) 68
- (70) G. Felsenfeld und H.T. Miles, Annu. Rev. Biochem. 36 (1967) 407
- (71) M. Yaniv und B.G. Barrell, Nature New Biol., 233 (71) 113
- (72) Squires und J. Carbon, Nature, in press
- (73) S.K. Dube, K.A. Marcker und A. Yudelevich, FEBS Letters, 9 (1970) 168
- (74) T. Igo-Kemenes, Dissertation, München (1970)
- (75) R. Thiede und H.G. Zachau, Biochem. Biophys. Res. Commun, 36 (1969) 1024
- (76) A. Danchin, FEBS Letters, 13 (1971) 152
- (77) P.G. Connors, M. Labanauskas und W.W. Beeman, Science, 166 (1969) 1528
- (78) J.F. Fredrick, Conference of Gelelectrophoresis, Ann. N. Y. Acad. Sci., 121 (1964) 305-650
- (79) E.G. Richards und W.B. Gratzer, Nature, 204 (1964) 878
- (80) E.G. Richards, J.A. Coll und W.B. Gratzer, Anal. Biochem., 12 (1965) 452

- (81) S. Hjerten, S. Jerstedt und A. Tiselius,
Anal. Biochem., 11 (1965) 211, 219
- (82) H. Gould, Biochemistry, 5 (1966) 1103
- (83) H. Gould, Biochim. Biophys. Acta, 123 (1966) 441
- (84) H. Gould, S. Bonanou und K. Kanagalingham,
J. Mol. Biol., 22 (1966) 397
- (85) H. Gould, J. Mol. Biol., 29 (1967) 307
- (86) P. McPhie, J. Hounsell und W.B. Gratzer, Biochemistry, 5 (1966) 988
- (87) J. Hindley, J. Mol. Biol., 30 (1967) 125
- (88) U.E. Loening und J. Ingle, Nature, 215 (1967) 363
- (89) U. E. Loening. Biochem. J., 102 (1967) 251
- (90) A.C. Peacock und C.W. Dingman, Biochemistry, 6 (1967) 1818
- (91) D.H.L. Bishop, J.R. Claybrook und S. Spiegelman,
J. Mol. Biol. 26 (1967) 373
- (92) H.R. Maurer, Disk-Elektrophorese, Verlag de Gruyter, Berlin, New York,
(1968) Kap. 1. 1. 2
- (93) S. Raymond und M. Nakamichi, Anal. Bioch., 3 (1962) 23
- (94) L. Ornstein, Artikel 2 in (78)
- (95) J.F. Jongkind, J.H. Wisse und H. Bloemendal, Prot. Biol. Fluids,
10 (1963) 77
- (96) H. Ott, Prot. Biol. Fluids, 10 (1963) 305
- (97) P. Philippsen, Diplom-Arbeit, München (1969)
- (98) M.L. White, J. Phys. Chem., 64 (1960) 1563
- (99) J. Margolis und K.G. Kenrick, Nature, 214 (1967) 1334
- (100) Siehe Seite 184 in (92)
- (101) J. Lunney, A. Chrambach und D. Rodbard, Anal. Biochem., 40 (1971) 158

- (102) L. Ingram, M.P. Tombs und A. Hurst, Anal. Biochem., 20 (1967) 24
- (103) D. Rodbard und A. Chrambach, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 65 (1970) 970
- (104) C. Gerthsen, Lehrbuch der Physik, Springer-Verlag, (1963) S. 212
- (105) A.C. Peacock und C.W. Dingman, Biochemistry, 7 (1968) 668
- (106) Siehe Kap. 1.3 in (92)
- (107) M.P. Fischer und C.W. Dingman, Biochemistry, 10 (1971) 1895
- (108) U.E. Loening, Biochem. J., 113 (1969) 131
- (109) U.E. Loening, K.W. Jones und M.L. Birnstiel, J. Mol. Biol., 45 (1969) 353
- (110) P.H.E. Groot, C. Aaij und P. Borst, Biochem. Biophys. Res. Commun., 41 (1970) 1321
- (111) H. Boedtker, Biochim. Biophys. Acta, 240 (1971) 448
- (112) H.C. Birnboim und J. Glickman, J. Chromat., 44 (1969) 581
- (113) E. Elson und T.M. Jovin, Anal. Biochem., 27 (1969) 193
- (114) H. J. Gould, J.C. Pinder, H.R. Matthews und A.H. Gordon, Anal. Biochem., 29 (1969) 1
- (115) G.A. Bray, Anal. Biochem., 1 (1960) 279
- (116) I. Gillam, S. Millward, D. Blew, M. v. Tigerstrom, E. Wimmer und G.M. Tener, Biochemistry, 6 (1967) 3043
- (117) E.G. Richards und R. Lecanidou, Anal. Biochem., 40 (1971) 43
- (118) W. Grassmann und K. Hannig, Klinische Wochenschrift, 32 (1954) 838
- (119) Ch. Wunderly, in: Electrophoresis, herausgegeben von Mylan Bier, Vol 1 (1959) S. 208
- (120) Siehe Kap. 2.3.8 in (92)
- (121) A.C. Peacock, persönliche Mitteilung an H.G. Zachau
- (122) M. Carrara und G. Bernardi, Biochemistry, 7 (1968) 1121

- (123) D.R. Harkness und R. J. Hilmoe, Biochem. Biophys. Res. Commun., 9 (1962) 393
- (124) D. Riesner, R. Römer und G. Maass, Biochem. Biophys. Res. Commun., 35 (1969) 369
- (125) H.G. Zachau, in: Methoden der enzymatischen Analyse (Hrsg. H.-U. Bergmeyer), 2. Auflage, Bd. 2, Verlag Chemie, Weinheim, (1970)
- (126) R. Rigler, E. Cronvall, R. Hirsch, U. Pachmann und H.G. Zachau, FEBS Letters, 11 (1970) 320
- (127) K. Daneck, G. Weimann und F. Cramer, Experientia, 21 (1965) 417
- (128) I.H. Maxwell, E. Wimmer und G.M. Tener, Biochemistry, 7 (1968) 2629
- (129) K. Takahashi, J. Biochem. (Tokio), 49 (1961) 1
- (130) M. Kunitz, J. Gen. Physiol., 24 (1941) 15
- (131) R. J. Hilmoe, persönliche Mitteilung an H.G. Zachau
- (132) F. Melchers, D. Dütting und H.G. Zachau, Biochim. Biophys. Acta, 108 (1965) 182

8. Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid
A	Adenosin
iA	N-6-Isopentenyladenosin
m ¹ A	1-Methyladenosin
m ⁶ A	6-Methyladenosin
Bis	NN'-Methylenbisacrylamid
C	Cytidin
Cm	2'-Methylcytidin
m ⁵ C	5-Methylcytidin
ac ⁴ C	4-Acetylcytidin
DEAE-	Diäthylaminoäthyl-
G	Guanosin
Gm	2'-Methylguanosin
m ¹ G	1-Methylguanosin
m ² G	2-Methylguanosin
m ₂ ² G	2-Dimethylguanosin
m ⁷ G	7-Methylguanosin
m ₂ ² G > p	Cyclophosphat der Dimethylguanylsäure
I	Inosin
Milz-PDE	Exonuclease aus Schweinemilz
N	Nucleotidzahl in Fragmenten
PAA	Polyacrylamid
PDE	Phosphodiesterase aus Schlangengift
mRNA	Matrizen-Ribonucleinsäure
tRNA	Transfer-Ribonucleinsäure
tRNA ^{Ser}	Serin-spezifische tRNA (und entspr. andere)
rRNA	Ribosomale RNA
tRNA ^{Phe} (HCl)	tRNA ^{Phe} nach Herausspalten des Basenanteils Y durch Säurebehandlung
SNN	Nuclease aus Schafsniere

T	Ribo-Thymidin
U	Uridin
hU	Dihydrouridin
Ψ	Pseudouridin
Y	Nucleosid neben dem Anticodon von tRNA ^{Phe}

Lebenslauf

Am 5. April 1942 wurde ich als zweites Kind des Geodäten Nikolaus Philippsen und seiner Frau Agnes, geborene Niemeyer, in Lüneburg geboren. 1948 wurde ich für vier Jahre in die Volksschule (Nikolaischule) zu Verden/Aller eingeschult und besuchte anschließend das Domgymnasium im selben Orte. Im Jahre 1957 zog meine Familie nach Osnabrück um, wo ich bis zum Abitur im Jahre 1961 Schüler des Gymnasium Carolinum war.

Ich begann mein Studium im Sommersemester 1961 in Münster zunächst mit den Fächern Mathematik, Physik und Chemie, ab Sommersemester 1962 jedoch entschied ich mich für ein reines Chemie-Studium. Die Vordiplomprüfung bestand ich im November 1964 in Münster. Im folgenden Sommersemester (1965) verlegte ich meinen Studienort nach München. An der Universität München fand dann meine Diplom-Hauptprüfung im November 1968 statt. Nach Beendigung der Diplomarbeit, die ich am Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie der Universität München unter Anleitung von Professor Dr. H.G. Zachau anfertigte, erhielt ich am 1. April 1969 das Diplom für Chemie.

Anschließend arbeitete ich am selben Institut unter der Anleitung von Professor Dr. H.G. Zachau weiter an meiner Dissertation über das Thema: "Spaltung von Transfer-Ribonucleinsäuren durch Exo- und Endonucleasen".

